

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**FACULTAD DE FARMACIA**



**TESIS DOCTORAL**

**¿Están los neonatos en riesgo de intoxicación por Manganeso?**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTORA

PRESENTADA POR

**Rita Martínez Manzanal**

Directores

Victoria Seijas Martínez-Echevarría  
Rafael Lozano Fernández

**Madrid, 2015**

# ¿ESTÁN LOS NEONATOS EN RIESGO DE INTOXICACIÓN POR MANGANESO?

RITA MARTÍNEZ MANZANAL

*UNIVERSIDAD COMPLUTENSE  
DE MADRID  
FACULTAD DE FARMACIA*



Madrid, 2015

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE FARMACIA**



# **¿ESTÁN LOS NEONATOS EN RIESGO DE INTOXICACIÓN POR MANGANESO?**

Memoria para optar al grado de doctora presentada por:

**Rita Martínez Manzanal**

Bajo la dirección de los Doctores:

**Victoria Seijas Martínez – Echevarría**

**Rafael Lozano Fernández**

**Madrid, 2015**

*A mis padres*

*A mis abuelos*

*A Júlia, Carla y Nora*

*A mi hermana y David*

## AGRADECIMIENTOS

Son muchas las personas que han hecho posible el desarrollo de esta Tesis Doctoral, tanto académica como personalmente, de las que no me quiero olvidar en estos agradecimientos.

En primer lugar quiero expresar mi más sincera gratitud, admiración y cariño a mis directores; la Dra. Victoria Seijas Martínez – Echevarría y el profesor. Dr. D. Rafael Lozano Fernández. Su dirección y conocimientos han sido fundamentales para poder realizar y finalizar esta tesis doctoral.

- *Victoria gracias por confiar en mí más que yo misma, por todo lo que me has enseñado en estos años, por tu paciencia, dedicación, cariño y amistad.*
- *Rafael gracias por tu tiempo, correcciones, consejos y críticas. Muchas gracias por confiar en este proyecto y sobre todo gracias por tu simpatía y carácter, que han hecho desde el primer momento que todo parezca fácil.*

En segundo lugar quiero mostrar mi más profundo agradecimiento a la Dra. Carmen Hernando de Larramendi, Jefe de Servicio de Análisis Clínicos del Hospital Universitario Severo Ochoa, por permitirme y facilitarme todos los medios a su alcance para realizar este trabajo de investigación en el hospital durante los cuatro años que estuve de Residente de Bioquímica Clínica.

- *Muchas gracias Carmen por tu ayuda y consejos en esta profesión por la que siento una gran pasión y a la que dedico gran parte de mi vida.*

Quiero hacer extensible este agradecimiento a todos los profesionales que forma parte del Servicio Análisis Clínicos de HUSO:

- *Gracias a todos los facultativos/as, por todo lo me habéis enseñado durante la residencia y sobre todo gracias por vuestro cariño, me he sentido muy querida. Os admiro, respeto y quiero profundamente.*
- *Gracias a mis “resis” pequeñas y grandes amigas (Arantza, Raquel y Ana), sois las mejores compañeras que jamás hubiese soñado. Gracias por estar siempre conmigo y sobre todo por alegraros de todo lo bueno que me pasa. Os quiero mucho.*

- *No me puedo olvidar de los residentes más pequeños; que aunque no he coincidido con ellos profesionalmente he compartido muy buenos momentos (Ester, Juan, Gonzalo, Marta y Elena).*
- *Gracias a todos los TELS, por vuestro cariño y por las noches que os habéis quedado vigilando el espectrofotómetro para que no se parase y tuviese que volver a empezar de nuevo el análisis.*

Al Dr. Pedro Sánchez Godoy (Jefe de Servicio de Hematología, HUSO), Dr. Benito García Díaz (Jefe de Servicio de Farmacia, HUSO) y a la Dra. Ersilia González, por haberme facilitado la sangre de cordón, leches artificiales, NPT y leches maternas respectivamente para el estudio.

A Pilar Montero y María Viñas por haberme ayudado a conseguir y enseñado a utilizar el gestor bibliográfico EndNote X7.

- *Pilar quiero agradecerte especialmente todo tu apoyo, tus consejos me han hecho madurar y sentirme mucho más segura de mí misma.*

A mi gran amigo Cabri:

- *porque siempre estás, por todo lo que me has ayudado con la informática y el word, sin ti estaría haciendo el índice a mano. Gracias por implicarte tanto sólo porque sabes lo importante que esto es para mí. Te quiero mucho.*

A mis buenas amigas Marta Montes, Arantza Anadón y Ana Cosmen, por sacrificar su tiempo y ayudarme con la traducción del Abstract.

- *Gracias por vuestra amistad incondicional*

A mi amigo Adrián Llaquet:

- *Gracias Adri por creer en mí, y porque nunca dudaste en que la terminaría.*

A mis grandes amigas/os (Leticia, Alba, Bibi, Nani y Hugo) porque aunque no tienen nada que ver con este mundo sus ánimos y fuerza han sido fundamentales.

A mis queridas “Avelinas” (Mamen, Ana Cosmen, Ana Díaz, Analy, Sandra, Teresa, Silvia, Beatriz, Africa y Raquel) por hacerme fácil el día a día.

A todos mis compañeros y ex compañeros del Hospital Santa Bárbara de Puertollano.

Por último quiero dar las gracias toda mi familia especialmente:

- *A mis güelitos: Manuel, Angel, Josefa y Maru.*
- *A mis tres sobrinas Júlia, Carla y Nora.*
- *A mi cuñado David por sus ánimos y cariño.*
- *Y especialmente a vosotros: **Papá, Mamá y Laura**; sois las personas más importantes de mi vida. Deseo que os sintáis orgullosos de mí. Sin vuestro amor incondicional, protección, sacrificio, paciencia y consejos no hubiera conseguido nada de lo que tengo actualmente, vosotros siempre estáis detrás de todos mis éxitos. **OS QUIERO.***

**“WE ARE SMARTER THAN ME”**



## ÍNDICE

<b>ÍNDICE</b> .....	<b>7</b>
<b>ÍNDICE DE TABLAS</b> .....	<b>10</b>
<b>ÍNDICE DE ILUSTRACIONES</b> .....	<b>13</b>
<b>ABREVIATURAS</b> .....	<b>15</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>16</b>
<b>1.- OBJETIVOS E HIPÓTESIS</b> .....	<b>21</b>
1.1.- HIPÓTESIS: .....	21
1.2.- OBJETIVOS: .....	21
1.2.1.- OBJETIVO PRINCIPAL: .....	21
1.2.2.- OBJETIVOS SECUNDARIOS:.....	21
1.3.- VARIABLES DE MEDIDA:.....	22
1.4.- MÉTODOS ESTADÍSTICOS .....	23
1.4.1.- ESTIMACIÓN DE LOS VALORES DE REFERENCIA. ....	23
1.4.2.- ESTIMACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE Mn EN NIÑOS DE 1 A 6 MESES.....	24
1.4.3.- ESTIMACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE Mn EN NIÑOS CON NPT .....	24
1.4.4.- ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS .....	24
1.5.- VALIDACIÓN DEL MÉTODO .....	25
1.5.1.- INTRODUCCIÓN .....	25
1.5.2.- INTERVALO DE TRABAJO Y LINEALIDAD.....	25
1.5.3.- EXACTITUD Y PRECISIÓN:.....	26
1.5.4.- LÍMITE DE DETECCIÓN.....	30
1.5.5.- LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN .....	30
<b>2.- PARTE GENERAL</b> .....	<b>31</b>
2.1.- ASPECTOS INORGÁNICOS DEL Mn .....	31
2.2.- DISTRIBUCIÓN Y USOS .....	33
2.3.- FUNCIONES BIOLÓGICAS DE Mn .....	33
2.3.1.- ESENCIALIDAD DEL Mn.....	33
2.3.2.- FISIOLÓGÍA DE LA ABSORCIÓN, METABOLISMO Y EXCRECCIÓN .	34
2.3.2.1.- ABSORCIÓN .....	35
2.3.2.2.- TRANSPORTE.....	36
2.3.2.3.- EXCRECCIÓN .....	36
2.3.3.- TRANSPORTE DEL Mn EN EL SNC .....	37
2.3.3.1.- TRANSPORTADOR SCL30A10: .....	38
2.3.3.2.- TRANSPORTADOR TRANSFERRINA: .....	38
2.3.3.3.- TRANSPORTADOR DMT-1: .....	39
2.3.3.4.- CITRATO: .....	40
2.3.3.5.- PROTEÍNAS TRANSPORTADORAS ZIP: .....	40
2.3.4.- EFECTOS CLÍNICOS DE LA INGESTA INADECUADA .....	40
2.3.5.- FACTORES QUE AFECTAN A LOS REQUISITOS DE Mn .....	42
2.3.5.1.- ESTUDIOS DE EQUILIBRIO Y DEPLECCIÓN .....	42
2.3.5.2.- BIODISPONIBILIDAD .....	43

2.3.5.3.- SEXO .....	43
2.3.5.4.- CONCENTRACIÓN DE Mn EN LECHE HUMANA (LACTANCIA) ...	43
2.3.5.5.- INGESTA DE Mn EN ADULTOS. ....	44
2.4.- TOXICIDAD .....	46
2.4.1.- EMBRIOTOXICIDAD .....	46
2.4.2.- NEUROTOXICIDAD .....	49
2.4.2.1.- NUTRICIÓN PARENTERAL .....	53
2.4.2.2.- INSUFICIENCIA HEPÁTICA.....	55
2.4.2.3.- ENCEFALOPATÍA HEPÁTICA CRÓNICA .....	56
2.4.3.- DIAGNÓSTICO .....	58
2.4.4.- BIOMARCADORES DE EXPOSICIÓN A Mn. ....	60
2.4.4.1.- Mn EN SANGRE: .....	60
2.4.4.2.- Mn EN SUERO: .....	61
2.4.4.3.- Mn EN ORINA:.....	62
2.4.4.4.- Mn EN CABELLO .....	62
2.4.4.5.- MRI:.....	63
2.4.4.6.- LINFOCITOS CON ACTIVIDAD MnSOD.....	63
2.4.5.- TERAPIA .....	63
2.4.5.1.- L-DOPA.....	63
2.4.5.2.- EDTA.....	64
2.4.5.3.- PAS .....	64
2.5.- NUTRICIÓN INFANTIL .....	65
2.5.1.- LACTANCIA NATURAL .....	65
2.5.2.- LACTANCIA ARTIFICIAL .....	70
2.5.2.1.- REQUERIMIENTOS NUTRICIONALES .....	70
2.5.2.2.- COMPOSICIÓN:.....	70
2.5.3.- NUTRICIÓN PARENTERAL EN NEONATOS .....	71
2.5.3.1.- COMPOSICIÓN DE LA NUTRICIÓN PARENTERAL .....	73
2.5.3.2.- ACCESO VASCULAR .....	77
2.5.3.3.- MONITORIZACIÓN DE LA AFECTACIÓN HEPÁTICA.....	78
2.5.3.4.- TOXICIDAD EN PACIENTES CON NPT .....	78
2.6.- ESPECTROSCOPIA DE ABSORCIÓN ATÓMICA.....	79
2.6.1.- INTRODUCCIÓN .....	79
2.6.2.- FUNDAMENTOS FÍSICO-QUÍMICOS .....	80
2.6.3.- INSTRUMENTACIÓN .....	81
2.6.3.1.- FUENTES DE RADIACIÓN .....	81
2.6.3.2.- ATOMIZADORES .....	83
2.6.3.3.- MONOCROMADOR .....	88
2.6.3.4.- DETECTORES DE FOTONES.....	89
2.6.4.- ESPECTROS DE ABSORCIÓN ATÓMICA.....	90
2.6.5.- INSTRUMENTOS PARA LA ESPECTROSCOPIA DE ABSORCIÓN ATÓMICA. ....	91
2.6.6.- INTERFERENCIAS.....	92
2.6.7.- MODIFICADORES QUÍMICOS.....	95
2.6.8.- APLICACIONES .....	95
2.7.- TEORIA DE VALORES DE REFERENCIA.....	96
2.7.1.- FUENTES DE VARIACIÓN .....	96
2.7.1.1.- LA EDAD .....	96
2.7.1.2.- LA INGESTA .....	96
2.7.1.3.- LAS VARIACIONES CIRCADIANAS Y ANUALES .....	96

2.7.1.4.- CAMBIO DE ESTACIONES.....	96
2.7.1.5.- EL SEXO .....	96
2.7.2.- SELECCIÓN DE LOS INDIVIDUOS DE REFERENCIA.....	96
2.7.3.- CRITERIOS DE INCLUSIÓN Y EXCLUSIÓN .....	97
2.7.4.- FACTORES PREANALÍTICOS .....	98
2.7.5.- CONTAMINACIÓN .....	99
2.7.6.- CRITERIOS DE PARTICIÓN DE LA POBLACIÓN .....	99
<b>3.- PARTE EXPERIMENTAL.....</b>	<b>100</b>
3.1.- POBLACIÓN, MATERIAL Y MÉTODOS .....	100
3.1.1.- POBLACIÓN .....	100
3.1.2.- MÉTODO .....	100
3.1.3.- REACTIVOS Y ESTÁNDARES .....	102
3.2.- OBTENCIÓN DE UN PICO DE ABSORBANCIA DEL Mn.....	103
3.3.- OPTIMIZACIÓN DEL MÉTODO .....	104
3.3.1.- INTENSIDAD DE LAMPARA, ALTURA Y ANCHO DE RENDIJA .....	104
3.3.2.- OPTIMIZACIÓN DEL PROGRAMA DE TEMPERATURAS.....	106
3.3.2.1.- FASE DE SECADO .....	106
3.3.2.2.- FASE DE CALCINACIÓN.....	108
3.3.2.3.- FASE DE ATOMIZACIÓN.....	111
3.3.3.- OPTIMIZACIÓN DEL PROGRAMA DE TIEMPOS .....	113
3.3.3.1.- FASE DE SECADO .....	113
3.3.3.2.- FASE CALCINACIÓN .....	118
3.3.3.3.- FASE ATOMIZACION .....	121
3.3.4.- INTRODUCCIÓN DE LA PLATAFORMA L'VOV: .....	123
3.3.5.- INTRODUCCIÓN DE CALIBRACIÓN POR ADICIONES ESTÁNDAR ..	126
3.3.6.- PROGRAMA OPTIMIZADO.....	132
3.4.- VALIDACIÓN DEL MÉTODO.....	134
3.4.1.- LINEALIDAD .....	134
3.4.2.- LÍMITE DE DETECCIÓN.....	136
3.4.3.- EVALUACIÓN DE PRECISIÓN Y EXACTITUD .....	136
3.5.- VALORES DE REFERENCIA EN NEONATOS SANOS .....	141
3.6.- EFECTO DE LOS CRITERIOS DE PARTICIÓN .....	149
3.7.- SANGRE DE CORDÓN vs NIÑOS DE 1 A 6 MESES.....	157
3.8.- Mn EN LACTANTES EN FUNCIÓN DEL SEXO.....	158
3.9.- NEONATOS vs LACTANTES (LECHE MATERNA).....	159
3.10.- NEONATOS vs LACTANTES (LECHE ARTIFICIAL).....	160
3.11.- LACTANTES (LECHE MATERNA VS ARTIFICIAL).....	161
3.12.- LACTANTES ALIMENTADOS CON NPT vs NEONATOS.....	162
3.13.- NIÑOS CON NPT vs LACTANCIA MATERNA .....	165
3.14.- NIÑOS CON NPT vs LACTANCIA ARTIFICIAL.....	166
3.15.- CONCENTRACIÓN DE Mn EN LECHE MATERNA .....	166
3.16.- CONCENTRACIÓN DE Mn EN LECHE ARTIFICIAL.....	167
3.17.- CONCENTRACIÓN DE Mn EN NPT .....	168
<b>4.- DISCUSIÓN.....</b>	<b>171</b>
<b>5.- CONCLUSIONES.....</b>	<b>180</b>
<b>6.- ANEXOS .....</b>	<b>182</b>
<b>7.- BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>185</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

<i>Tabla 1-1: Variables medidas</i>	22
<i>Tabla 2-1: Ingesta adecuada para niños de 0 a 12 meses</i>	44
<i>Tabla 2-2: Ingesta adecuada para niños de 1 a 18 años</i>	44
<i>Tabla 2-3: Ingesta adecuada de Mn a partir de los 19 años</i>	45
<i>Tabla 2-4: Ingesta adecuada de Mn en el embarazo</i>	45
<i>Tabla 2-5: Ingesta adecuada de Mn en mujeres durante la lactancia</i>	46
<i>Tabla 2-6: Indicaciones de la nutrición parenteral</i>	72
<i>Tabla 2-7: Requerimientos basales de líquidos y electrolitos</i>	73
<i>Tabla 2-8: Requerimientos energéticos del recién nacido</i>	74
<i>Tabla 2-9: Necesidades de calcio, fósforo y magnesio (por kg y día)</i>	75
<i>Tabla 2-10: Requerimientos diarios de vitaminas en unidades/kg/día</i>	75
<i>Tabla 2-11: Requerimientos diarios de oligoelementos (mg/kg/día)</i>	76
<i>Tabla 2-12: Factores asociados con la afectación hepática asociada a la NPT</i>	77
<i>Tabla 2-13: Propiedades de la llama</i>	84
<i>Tabla 2-14: Los cinco criterios del Apgar</i>	97
<i>Tabla 3-1: Programa de temperaturas, tiempo, flujo de gas y lectura</i>	104
<i>Tabla 3-2: Señal de Absorbancia para las distintas combinaciones de intensidad de lámpara, altura y ancho de rendija</i>	106
<i>Tabla 3-3: Programa de temperaturas, tiempo, flujo de gas y lectura. (Temperatura de secado variable)</i>	107
<i>Tabla 3-4: Señales de absorbancia para distintas temperaturas de secado</i>	108
<i>Tabla 3-5: Programa de temperaturas, tiempo, flujo de gas y lectura. (Temperatura de calcinación variable)</i>	109
<i>Tabla 3-6: Señales de absorbancia para distintas temperaturas de calcinación</i>	110
<i>Tabla 3-7: Programa de temperaturas, tiempo, flujo de gas y lectura. (Temperatura de atomización variable)</i>	112
<i>Tabla 3-8: Señales de absorbancia para distintas temperaturas de atomización</i>	112
<i>Tabla 3-9: Programa de temperaturas, tiempo, flujo de gas y lectura. (Tiempo de secado variable)</i>	114
<i>Tabla 3-10: Señales de absorbancia para distintos tiempos de secado</i>	114
<i>Tabla 3-11: Influencia del modificador en el pico de absorbancia</i>	115
<i>Tabla 3-12: Programa de temperaturas, tiempo, flujo de gas y lectura. (Tiempo de secado variable)</i>	117
<i>Tabla 3-13: Señales de absorbancia para distintos tiempos de secado, con la introducción del modificador Nitrato de Pd</i>	118
<i>Tabla 3-14: Programa de temperaturas, tiempo, flujo de gas y lectura. (Tiempo de calcinación variable)</i>	119
<i>Tabla 3-15: Señales de absorbancia para distintos tiempos de calcinación</i>	120
<i>Tabla 3-16: Programa de temperaturas, tiempo, flujo de gas y lectura. (Tiempo de atomización variable)</i>	122
<i>Tabla 3-17: Señales de absorbancia para distintos tiempos de atomización</i>	122
<i>Tabla 3-18: Programa de temperaturas, tiempo, flujo de gas y lectura optimizado</i>	124
<i>Tabla 3-19: Programa de temperaturas, tiempo, flujo de gas y lectura con nuevas modificaciones en los tiempos y temperaturas de atomización</i>	127
<i>Tabla 3-20: Programación del muestreador calibración por adiciones estándar</i>	127
<i>Tabla 3-21: Primera calibración por adiciones estándar</i>	127

<i>Tabla 3-22: Segunda calibración por adiciones estándar</i>	128
<i>Tabla 3-23: Tercera calibración por adiciones estándar</i>	129
<i>Tabla 3-24: Programación del muestreador calibración acuosa</i>	129
<i>Tabla 3-25: Primera calibración acuosa</i>	129
<i>Tabla 3-26: Segunda calibración acuosa</i>	130
<i>Tabla 3-27: Tercera calibración acuosa</i>	130
<i>Tabla 3-28: Pendientes de las calibraciones acuosas y por adición estándar</i>	131
<i>Tabla 3-29: Estadísticos de grupo para las calibraciones acuosas y por adición estándar.</i>	131
<i>Tabla 3-30: Prueba t para igualdad de medias de las pendientes</i>	132
<i>Tabla 3-31: Programa del muestreador optimizado.</i>	133
<i>Tabla 3-32: Programa de temperaturas, tiempo, flujo de gas optimizado</i>	133
<i>Tabla 3-33: Programación del muestreador para estudio de la linealidad</i>	134
<i>Tabla 3-34: Absorbancias obtenidas en el estudio de linealidad</i>	134
<i>Tabla 3-35: Estudio Límite de detección y Límite de Cuantificación</i>	136
<i>Tabla 3-36: Evaluación de la Precisión y Exactitud</i>	137
<i>Tabla 3-37: Variabilidad intraserial (<math>S_r</math>) e Imprecisión intermedia del laboratorio (<math>S_L</math>)</i>	139
<i>Tabla 3-38: Límite de confianza</i>	140
<i>Tabla 3-39: Estimación de la repetibilidad en el nivel bajo del control interno</i>	140
<i>Tabla 3-40: Estimación de la repetibilidad en el nivel alto del control interno</i>	141
<i>Tabla 3-41: Concentración de Mn en sangre de cordón umbilical</i>	141
<i>Tabla 3-42: Prueba de Kolmogorov-Smirnov para las concentraciones de Mn en sangre de cordón.</i>	144
<i>Tabla 3-43: Estadísticos descriptivos de la concentración de Mn en sangre de cordón</i>	145
<i>Tabla 3-44: Coeficientes de asimetría y curtosis, que indican cómo se aleja la curva de las concentraciones de Mn en sangre de cordón de la campana de Gauss</i>	145
<i>Tabla 3-45: Percentiles de la distribución original de Mn en sangre de cordón</i>	145
<i>Tabla 3-46: Estimación calculada de las distintas medias para ser resistentes a los valores atípicos.</i>	146
<i>Tabla 3-47: Estimación de la escala en estudio de valores atípicos en la concentración de Mn en neonatos.</i>	146
<i>Tabla 3-48: Valores mayores y menores de la concentración de Mn en la población de neonatos</i>	147
<i>Tabla 3-49: Estadísticos descriptivos de la concentración de Mn en sangre de cordón eliminando los valores atípicos.</i>	148
<i>Tabla 3-50: Porcentaje de nuestra población de neonatos que tienen una concentración de Mn superior al LSN</i>	149
<i>Tabla 3-51: Distribución de la concentración de Mn en neonatos según el Apgar a los 5 minutos</i>	150
<i>Tabla 3-52: Distribución de la concentración de Mn en neonatos según el tipo de parto</i>	151
<i>Tabla 3-53: Distribución de la concentración de Mn en neonatos según el sexo</i>	152
<i>Tabla 3-54: Distribución de la concentración de Mn en neonatos según el peso al nacer</i>	153
<i>Tabla 3-55: Distribución de la concentración de Mn en neonatos según la edad gestacional al nacer</i>	154
<i>Tabla 3-56: Distribución de la concentración de Mn en neonatos según la edad agrupada de la madre</i>	155
<i>Tabla 3-57: Distribución de la concentración de Mn en neonatos según la bilirrubina</i>	156

<i>Tabla 3-58: Medianas de la concentración de Mn en neonatos y en niños de 1 a 6 meses</i> .....	157
<i>Tabla 3-59: Concentración de Mn en niños de 1 a 6 meses</i> .....	158
<i>Tabla 3-60: Rango promedio en niños de 1 a 6 meses respecto al sexo.</i> .....	159
<i>Tabla 3-61: Medianas de la concentración de Mn en neonatos y lactantes con distinto tipo de nutrición</i> .....	159
<i>Tabla 3-62: Rangos promedio de la concentración de Mn en sangre para niños alimentados con leche materna y artificial.</i> .....	161
<i>Tabla 3-63: Prueba U de Mann-Whitney para comparación de la concentración de Mn en niños alimentados con leche materna y leche artificial</i> .....	161
<i>Tabla 3-64: Concentración de Mn, sexo, edad, días con NPT y diagnóstico en niños que reciben NPT.</i> .....	162
<i>Tabla 3-65: Rangos promedio de la concentración de Mn en sangre para niños alimentados con NPT vs neonatos.</i> .....	164
<i>Tabla 3-66: Percentiles de la concentración de Mn en sangre de los niños que reciben NTP</i> .....	165
<i>Tabla 3-67: Rangos promedio de la concentración de Mn en sangre en niños con NPT vs niños con lactancia materna</i> .....	165
<i>Tabla 3-68: Prueba U de Mann-Whitney para comparación de la concentración de Mn en niños con NPT vs niños con lactancia materna</i> .....	165
<i>Tabla 3-69: Rangos promedio de la concentración de Mn en sangre en niños con NPT vs niños con lactancia artificial</i> .....	166
<i>Tabla 3-70: Prueba U de Mann-Whitney para comparación de la concentración de Mn en niños con NPT vs niños con lactancia artificial</i> .....	166
<i>Tabla 3-71: Concentración de Mn en leche materna</i> .....	166
<i>Tabla 3-72: Concentración de Mn en distintas leches artificiales</i> .....	167
<i>Tabla 3-73: Concentración de Mn en distintas NPT</i> .....	168
<i>Tabla 3-74: Recomendación de líquidos en NPT</i> .....	169
<i>Tabla 3-75: Recomendaciones de la American Society for Clinical Nutrition</i> .....	170



## ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

<i>Ilustración 2-1: Esquema de un espectrofotómetro de absorción atómica</i> .....	81
<i>Ilustración 2-2: Plataforma L'vov y su posición en el horno de grafito</i> .....	86
<i>Ilustración 2-3: Monocromador de red de Czerny-Turner</i> .....	88
<i>Ilustración 2-4: Monocromador de prisma de Bunsen</i> .....	88
<i>Ilustración 2-5: Perfil de una línea atómica</i> .....	90
<i>Ilustración 2-6: Esquema de espectrofotómetro de un solo haz</i> .....	91
<i>Ilustración 2-7: Esquema de espectrofotómetro de doble haz</i> .....	92
<i>Ilustración 2-8: Sección del cordón umbilical</i> .....	98
<i>Ilustración 2-9: Punción de la vena umbilical</i> .....	99
<i>Ilustración 3-1: Espectrofotómetro de Absorción atómica modelo SpectraAA-300</i> .....	101
<i>Ilustración 3-2: Muestreador automático programable PSD-100</i> .....	102
<i>Ilustración 3-3: Primera calibración por adiciones estándar</i> .....	128
<i>Ilustración 3-4: Segunda calibración por adiciones estándar</i> .....	128
<i>Ilustración 3-5 Tercera calibración por adiciones estándar</i> .....	129
<i>Ilustración 3-6: Primera calibración acuosa</i> .....	130
<i>Ilustración 3-7: Segunda calibración acuosa</i> .....	130
<i>Ilustración 3-8: Tercera calibración acuosa</i> .....	131
<i>Ilustración 3-9: Estudio de linealidad</i> .....	135
<i>Ilustración 3-10: Recta de regresión en el estudio de la linealidad</i> .....	135
<i>Ilustración 3-11: Estimación de la imprecisión por medio de una recta de regresión representando las desviaciones estándar correspondientes a cada concentración de sueros de referencia</i> .....	139
<i>Ilustración 3-12: Curva de la concentración de Mn en sangre de cordón</i> .....	145
<i>Ilustración 3-13: gráfico de valores atípicos para la concentración de Mn en neonatos</i> .....	146
<i>Ilustración 3-14: Histograma de la concentración de Mn en sangre de cordón eliminando valores atípicos</i> .....	148
<i>Ilustración 3-15: Distribución de la concentración de Mn en neonatos según el Apgar a los 5 minutos</i> .....	150
<i>Ilustración 3-16: Distribución de la concentración de Mn en neonatos según el tipo de parto</i> .....	151
<i>Ilustración 3-17: Distribución de la concentración de Mn en neonatos según el sexo</i> ..	152
<i>Ilustración 3-18: Distribución de la concentración de Mn en neonatos según el peso al nacer</i> .....	153
<i>Ilustración 3-19: Distribución de la concentración de Mn en neonatos según la edad gestacional al nacer</i> .....	154
<i>Ilustración 3-20: Distribución de la concentración de Mn en neonatos según la edad agrupada de la madre</i> .....	155
<i>Ilustración 3-21: Distribución de la concentración de Mn en neonatos según la bilirrubina</i> .....	156
<i>Ilustración 3-22: Concentración de Mn en sangre de cordón vs concentración de Mn en niños de 1 a 6 meses</i> .....	157
<i>Ilustración 3-23: Concentración de Mn en sangre de cordón vs niños de 1 a 6 meses con lactancia materna</i> .....	160

<i>Ilustración 3-24: Concentración de Mn en sangre de cordón vs niños de 1 a 6 meses con lactancia artificial. ....</i>	<i>161</i>
<i>Ilustración 3-25: Prueba U de Mann-Whitney para comparación de la concentración de Mn en cordón vs niños de 1 a 6 meses que reciben NPT .....</i>	<i>164</i>



## ABREVIATURAS

- AOAC:** The Association of Analytical Communities  
**BHE:** Barrera Hematoencefálica  
**CLSI** Clinical and Laboratory Standards Institute  
**EHC:** Encefalopatía Hepática Crónica  
**EP:** Enfermedad de Parkinson  
**ET:** Elemento Traza  
**FDA:** Food and Drug Administration  
**HUSO:** Hospital Universitario Severo Ochoa  
**ICH:** International Conference on Harmonization  
**ISO:** International Organization for Standardization  
**IUPAC:** The International Union of Pure and Applied Chemistry  
**LC:** Limited de cuantificación  
**LC<sub>95%</sub>:** Intervalo de confianza al 95%  
**LD:** Limited de detección  
**MMT:** Metilciclopentadienil Manganeso Tricarbonilo  
**NCCLS:** National Committee for Clinical Laboratory Standards  
**NPT:** Nutrición Parenteral Total  
**PET:** Positron emission tomography  
**RMN:** Resonancia Magnética Nuclear  
**SD:** Desviación Estándar  
**SFSTP:** Société Française des Sciences et Techniques Pharmaceutiques  
**SNC:** Sistema Nervioso Central  
**SNpc:** Neuronas dopamina nigroestriatales de la sustancia negra pars compacta  
**SPECT:** Photon emission computed tomography  
**Tf:** Transferrina

## ABSTRACT

### ARE NEONATES AT RISK OF MANGANESE INTOXICATION?

#### Introduction:

Manganese is an essential trace nutrient that is potentially toxic at high levels of exposure. Manganese is required as a catalytic cofactor for a variety of important enzymatic reactions and is incorporated into the active center of various metalloenzymes; arginase, glutamine synthetase, xylosyltransferases, glycosyltransferases, and most notably manganese superoxide dismutase (SOD).

The main source of manganese to the general population is the diet, but human exposure to manganese can occur through environmental exposure because manganese is abundant in the earth's crust and commonly found in air, water, and soil.

Manganese is absorbed throughout the small intestine, but the coefficient of absorption is very low. Absorption is decreased following high dietary intakes or if total body manganese status is good and it is increased in the setting of iron deficiency. Following absorption, manganese is transported into the portal blood bound to albumin, alpha-2-macroglobulin and transferrin.

Once taken up by the liver, a proportion is rapidly excreted into the bile, therefore, potential risk for manganese toxicity is highest when bile excretion is low, such as in neonates or in liver disease.

Manganese related embryotoxic and fetotoxic effects have been observed in humans, including decreased fetal size and weight, risk of fetal neural tube defects, poor fetal neurobehavioral development and neurotoxicity. Exposure to manganese is related to attention deficit, hyperactivity disorder, lower intelligence quotient and increased motor impairment in children.

While only a small percentage of manganese is absorbed from food sources, almost all intravenously administered manganese is retained. This has raised concern for potential manganese toxicity from parenteral nutrition solutions containing manganese, which is a standard component of the trace element mixture commonly added to the solution. Intravenously fed neonates may be at risk, particularly if they have cholestasis, which decreases manganese excretion.

Elevations in whole blood manganese concentrations are often found in individuals on chronic parenteral nutrition, and correlate with manganese-associated changes in signal intensity on brain MRI.

Manganese toxicity is a well-recognized hazard in workers exposed to manganese aerosols or dust; it has also been reported in individuals drinking well water with high concentrations of manganese. Environmental or occupational exposure to high levels of manganese can cause a neuropathy resembling idiopathic Parkinson's disease, commonly referred to as manganism. Manganism and Parkinson's disease are both characterized by motor and psychiatric disturbances and damage to nuclei of the basal ganglia, particularly the substantia nigra, with altered dopamine (and its metabolites) contributing to these disorders.

## Objectives

This study aims to consider the hypothesis of whether newborns could be at risk of manganese intoxication when receiving TPN.

To evaluate this hypothesis, the **main objective** established is to obtain the reference values for the concentration of Mn in the umbilical cord blood of our population of newborns, with the possible variables of influence: age of mother, gestational age, gender, weight at birth, Apgar and type of delivery. The following are furthermore established as **secondary objectives**:

- Optimisation and validation of the Mn quantification method in biological samples by means of graphite furnace atomic absorption spectrophotometry, with Zeeman correction.
- Ascertain what percentage of the newborn population treated at the HUSO has a concentration of Mn in umbilical cord blood in excess of the Upper Limit of Normal (ULN). Employing as the initial value the figure cited in the bibliography, reference range: 3.93 – 11.39 µg/L.
- Quantification of the concentration of Mn in the blood of infants receiving TPN and healthy children up to the age of six months fed on artificial milk or breastmilk.
- Determination of the concentration of Mn in commercial milk formulas, TPN preparations and breastmilk.

## Results

1. **An analytical method by means of atomic absorption spectrophotometry with Zeeman background correction and graphite furnace was refined to determine Mn in biological samples (total blood, breastmilk, artificial milk, TPN)**, by means of acid digestion of the samples with diluted  $\text{HNO}_3$  to precipitate the proteins, using 2% palladium nitrate as the modifier, favouring the thermal stability of the analyte. The L'Vov platform was used to reduce interferences generated by the most volatile compounds of the analyte, calcining at  $1400^\circ\text{C}$  and atomising at  $2600^\circ\text{C}$ . Calibration is performed by the standard additions method to achieve uniformity among the calibrators and samples, thereby increasing sensitivity. We use Tritón X100/ $\text{HNO}_3$  as detergent to eliminate carbonaceous residues. Work is performed under STPF conditions, lamp intensity: 4mA, slit height: 0.1nm, normal slit width, wavelength: 279.5nm and photomultiplier: 556.2 Volts.
2. Upon completion of optimisation, we then **validate the method in accordance with standard UNE-EN-ISO 17025**; determining the linearity (45  $\mu\text{g/L}$ ), detection limit (0.37  $\mu\text{g/L}$ ), quantification limit (1.11 $\mu\text{g/L}$ ), precision ( $\text{Sr} = 0.056\%$  and  $0.101\%$ , high and low control respectively,  $\text{S}_\text{L} = 0.326$  and  $0.578$ , high and low control respectively), exactitude ( $\text{LC } 95\% = 9.77\text{--}10.79\mu\text{g/L}$ , low control,  $\text{LC } 95\% = 13.44\text{--}14.70\mu\text{g/L}$ , high control) and repeatability ( $\text{CV} = 7.27\%$ , low control,  $\text{CV} = 5.37\%$ , high control).
3. We then **determine the reference values of our population of newborns**. Stratified sampling was performed over 8 months of 124 anonymous, healthy newborns (Apgar above 6 after 5 minutes) in order to avoid any bias as a result of differences in maternal nutrition depending on the season of the year. No differences are expected by gender or race, and so no stratification is performed according to these variables. The analysis was performed in umbilical cord blood collected in tubes with EDTA anticoagulant, kept frozen at  $-80^\circ\text{C}$  until processing. Following elimination of atypical values, a total of 119 newborns is studied. The distribution obtained reveals a kurtosis and asymmetry deviating from the Gaussian distribution (median = 7.74  $\mu\text{g/L}$ ,  $\text{P}_{2.5} = 2.62\text{ }\mu\text{g/L}$ ,  $\text{P}_{97.5} = 31.30\text{ }\mu\text{g/L}$ ).  
Assuming that the distribution is not parametric, and using the Kruskal-Wallis test, we find that there are no statistically significant differences between the concentration of Mn in the umbilical cord blood, nor the Apgar ( $p = 0.456$ ), type of delivery ( $p =$

0.454), gender ( $p= 0.701$ ), weight at birth ( $p= 0.190$ ) or gestational age ( $p= 0.773$ ). However, the effect of serum bilirubin concentration almost attains a significant level ( $p= 0.052$ ) when applying the Mann-Whitney U test.

**4. The concentration of Mn is determined in infants aged from 1 to 6 months fed on breastmilk or artificial milk.**

- In the lactating infants studied, there are no statistically significant differences ( $p= 0.570$ ) in the concentration of Mn in blood or gender.
- The non-parametric Mann-Whitney test reveals statistically significant differences ( $p= 0.018$ ) between the concentration of Mn in newborns ( $7.74 \mu\text{g/L}$ ) and infants aged 1 to 6 months ( $5.27 \mu\text{g/L}$ ). This concentration drops to  $4.59 \mu\text{g/L}$  in those infants receiving only breastmilk ( $p= 0.003$ ).
- On performing the non-parametric Mann-Whitney U test, no statistically significant differences were found ( $p= 0.175$ ) in the concentration of Mn in blood of infants fed on breastmilk ( $4.59 \mu\text{g/L}$ ) and children fed on artificial milk ( $9.305 \mu\text{g/L}$ ), although these differences in concentration are probably not statistically significant because the concentrations of Mn in the artificial milk samples analysed revealed considerable dispersion.
- Nor are statistically significant differences found ( $p= 0.128$ ) upon comparison by means of the non-parametric Mann-Whitney U test in the medians of concentration of Mn of lactating infants aged 1 to 6 months fed on artificial milk ( $9.3 \mu\text{g/L}$ ) compared with the newborns ( $7.70 \mu\text{g/L}$ ).

**5. The concentrations of Mn in the analysed samples of breastmilk and artificial milk were  $2.86 \mu\text{g/L}$  and  $34.76 \mu\text{g/L}$ , respectively, entailing an ingestion of  $1.18 \mu\text{g/L}$  of Mn per day in children fed on breastmilk and  $16.51 \mu\text{g/L}$  of Mn per day in children fed on artificial milk.**

**6. In our study we observed that the quantity of Mn administered to newborns via parenteral feeding was  $56 \mu\text{g/L}$ . In TPN, percentile 95 of the concentrations was  $24.54 \mu\text{g/L}$ , in other words in the group of infants studied who receive TPN, there are not 15% with a concentration of Mn in blood higher than the ULN of our reference population ( $31.008 \mu\text{g/L}$ ).**

The median concentration in infants with TPN ( $7.290 \mu\text{g/L}$ ) is significantly higher ( $p= 0.047$ ) than the concentration in healthy children aged between 1 and 6 months fed on breastmilk ( $4.590 \mu\text{g/L}$ ).

## Conclusions:

- The method developed to determine Mn in biological samples reveals excellent exactitude and precision, and appropriate analytical times for implementation in routine clinical laboratory procedures.
- 29% of the newborns studied have concentrations of Mn higher than 11.39 µg/L (ULN reported by other authors). The reference values range from 2.62 µg/L to 31.3 µg/L, and are not influenced by the Apgar, type of delivery, gender, weight at birth, gestational age or bilirubin. However, the effect of the last factor almost proved significant.
- The concentration of Mn in infants aged 1 to 6 months falls in comparison with the concentration of Mn in newborns by at least 2 µg/L. This decline is greater in children fed on breastmilk.
- Children fed on artificial milk have a distinctly higher ingestion of Mn than the international recommendation, and their levels of Mn in blood are therefore higher than infants fed on breastmilk, and do not decline as expected in comparison with the newborns.
- This suggests that the concentration of Mn in blood could be a useful biomarker, as it would seem to be linked to dietary ingestion.
- We did not find newborns in TPN with a range of Mn concentration compatible with intoxication. However, the increase in the concentration of Mn in children with TPN in comparison with those fed on breastmilk demonstrates the tendency of a possible risk of intoxication through accumulation of Mn. Our data are therefore included within the growing body of evidence of the possible toxicity of Mn.
- The scant evidence of documented cases of Mn deficiency prompt us to recommend that it is not necessary routinely to add Mn to TPN regimes.

## **1.- OBJETIVOS E HIPÓTESIS**

### **1.1.- HIPÓTESIS:**

Los neonatos pueden estar en riesgo de acumulación de manganeso (Mn) cuando reciben nutrición parenteral total (NPT), se espera que asintomáticos.

En nuestro estudio la población de referencia serán los nacidos en Leganés, en el Hospital Universitario Severo Ochoa (HUSO).

### **1.2.- OBJETIVOS:**

#### **1.2.1.- OBJETIVO PRINCIPAL:**

Obtención del rango de referencia propio de la concentración de Mn en sangre de neonatos, con las posibles variables de influencia como la edad materna, edad gestacional, sexo, peso al nacer, Apgar, y tipo de parto.

#### **1.2.2.- OBJETIVOS SECUNDARIOS:**

- Optimización y validación del método de cuantificación de Mn en muestras biológicas por espectrofotometría de absorción atómica en horno de grafito, con corrección Zeeman.
- Encontrar qué porcentaje de la población neonata que atiende el HUSO, tiene una concentración de Mn en sangre de cordón superior al Límite Superior de la Normalidad (LSN). Usando como dato previo el citado en la bibliografía, rango de referencia: 3,93 – 11,39 µg/L [1].
- Cuantificación de la concentración de Mn en sangre en niños que reciben NPT y niños sanos hasta los seis meses de edad alimentados con leche artificial o leche materna.
- Determinación de la concentración de Mn en fórmulas comerciales de lactancia, preparados de NPT y en leche materna.

### 1.3.- VARIABLES DE MEDIDA:

Para la realización del estudio se recogerán las siguientes variables:

**Tabla 1-1:** Variables medidas

NEONATOS	NIÑOS 1 –6 MESES	NIÑOS CON NPT
Concentración sanguínea de Mn (µg/L)	Concentración sanguínea de Mn (µg/L)	Concentración sanguínea de Mn (µg/L)
Edad materna	Edad	Edad
Edad gestacional	Tipo lactancia (natural/artificial)	Días con NPT
Sexo (H/M)	Sexo (H / M)	Sexo (H / M)
Peso al nacer (g)		Diagnóstico
Apgar		
Tipo de parto		
Bilirrubina Total		

Se medirá también el contenido de Mn en leches maternas, en las leches artificiales usadas en esos meses en el hospital y en la NPT aportada.

Se elaborará un consentimiento informado para las madres donantes de leche, donde se les explicará el objetivo del estudio (ver anexo1 y anexo 2).



## 1.4.- MÉTODOS ESTADÍSTICOS

### 1.4.1.- ESTIMACIÓN DE LOS VALORES DE REFERENCIA.

**La población** a la que se referirá el estudio es la de neonatos del HUSO de Leganés, Madrid. Según la memoria de actividad asistencial publicada por el hospital en 2007, el número de nacimientos en 2006 fue de 1735 niños.

Las muestras propuestas serán sangre de cordón anónima, sin identificación del paciente.

El **tamaño de muestra** necesario para estimar la distribución, asumida como normal, de concentraciones sanguíneas de Mn en neonatos mediante la media, se ha calculado utilizando la fórmula:

$$N = \frac{z_{\alpha}^2 \cdot s^2}{i^2}$$

Siendo:

N= tamaño muestral,

$s^2$  = variabilidad, se mide por la variancia de la distribución en otros estudios publicados [2]

$s = 2,19 \mu\text{g/L}$

$i^2$  = la precisión,  $2i$  es la amplitud del intervalo de confianza de la estimación, que se asume como de un 0,4

$Z_{\alpha}$  = nivel de confianza deseado, se fija en el 95%,  $\alpha = 0,05$ , el valor en las tablas es de 1,96. Indica con qué confianza se afirmará que el verdadero valor de la media de Mn en suero de neonatos se sitúa en ese rango.

$$N = \frac{1.96^2 \times 2,19^2}{0,2^2} = 105,8 \approx 106 \text{ Niños}$$

Los **106 niños** escogidos deben ser representativos de la población, para evitar sesgos por la distinta alimentación materna según la estación del año, se realizará un muestreo estratificado por meses. Se realizará durante ocho meses, se seleccionarán los 106 niños de la siguiente forma:

- o 14 neonatos en diciembre, febrero, y mayo (42 muestras), y 13 en noviembre, enero, marzo, julio y agosto (65 muestras).
- o Se espera que no exista diferencia por sexos, por lo que no se estratifica según esa variable.

#### 1.4.2.- ESTIMACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE Mn EN NIÑOS DE 1 A 6 MESES

En niños de 1 a 6 meses la concentración sanguínea de Mn se espera que disminuya respecto a los neonatos al menos 2 µg/L [3]. La bajada será superior en los que reciban lactancia materna.

El cálculo del tamaño muestral para comparar las dos poblaciones, la neonata y a los seis meses será según la fórmula:

$$N = \frac{2(z_{\alpha} + z_{\beta})^2 s^2}{d^2}$$

Siendo  $s = 2,19$ ;  $z_{\alpha} = 1,96 = z_{0,05}$  y  $z_{\beta} = 0,842 = z_{0,2}$  y  $d = 2$

$N = 19$  niños, aproximamos al superior, **20 niños**.

#### 1.4.3.- ESTIMACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE Mn EN NIÑOS CON NPT

La hipótesis es que al menos el 15% de estos niños presentarán concentraciones de Mn superiores al LSN.

En una población normal, por definición el 2,5% de la población tiene concentraciones superiores al LSN y otro 2,5% inferiores, dado que el rango de referencia se define como el 95% central.

En la población que recibe NPT esperamos un 15% superior al LSN, el cálculo del tamaño muestral con estas asunciones se realiza con la fórmula:

$$N = \frac{\left| z_{\alpha} \sqrt{2p(1-p)} + z_{\beta} \sqrt{p_1(1-p_1) + p_2(1-p_2)} \right|}{(p_1 - p_2)}$$

Donde  $p_1 = 0,15$ ,  $p_2 = 0,025$ ,  $p = 0,1125$ ,  $z_{\alpha} = 1,96$ , y  $z_{\beta} = 0,842$

$N = 8,88$ , son necesarios **9 niños** con NPT.

#### 1.4.4.- ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS

Mediante paquete estadístico SPSS, disponible en el Hospital Universitario Severo Ochoa.

## **1.5.- VALIDACIÓN DEL MÉTODO [259]**

### **1.5.1.- INTRODUCCIÓN**

Para demostrar que un método es válido para el uso previsto, la norma UNE-EN-ISO 17025, propone una serie de parámetros a determinar en función del método utilizado: exactitud, precisión, intervalo de trabajo, linealidad, límites de detección y cuantificación incertidumbre, etc.

Los parámetros que es preciso determinar difieren según el alcance del método analítico a validar. En el caso de los diversos análisis de los elementos traza, que los hay de dos tipos: esenciales y tóxicos, estamos hablando de determinaciones cuantitativas de un componente y en ellas los criterios a determinar son fundamentalmente: precisión, exactitud, límite de cuantificación y detección, linealidad. No obstante, en el caso de los elementos tóxicos la determinación del límite de detección es bastante más importante que en los elementos esenciales en los que su determinación podría incluso no ser necesaria.

### **1.5.2.- INTERVALO DE TRABAJO Y LINEALIDAD.**

Para cualquier tipo de método cuantitativo es necesario determinar el intervalo de trabajo de concentraciones en el que el método puede ser aplicado correctamente. El nivel más bajo del intervalo depende del Límite de Detección o el de Cuantificación mientras que el límite superior dependerá del nivel de respuesta del equipo instrumental

La medida de la linealidad es una parte importante de la validación de un método, según la norma ISO 17025.

Un método analítico cuantitativo es lineal cuando existe una relación de línea recta, verificada matemáticamente, entre el valor producido por el método y la verdadera concentración o actividad del analito. El valor de la relación lineal se debe a su simplicidad matemática y a la facilidad de interpolación de los resultados.

La linealidad está relativamente relacionada con la exactitud, y es diferente de la precisión. Podría reflejar una medida interna de la exactitud ya que refleja en qué grado responde el sistema a una secuencia de diluciones en la propia matriz.

### 1.5.3.- EXACTITUD Y PRECISIÓN:

Todo método analítico lleva implícito un error sistemático y un error aleatorio. Estos parámetros son inherentes a cada método y son desconocidos en un principio, hallándose una estimación de ambos mediante los experimentos que se llevan a cabo durante la validación del método, siendo los resultados más fiables si el diseño de la validación es adecuado. Sin embargo, es importante tener en cuenta que todavía no existe un consenso global entre los documentos reguladores de los diferentes organismos (ISO, SFSTP, ICH, EURACHEM, NCCLS, IUPAC, AOAC, FDA.)

#### a) Precisión

La precisión se define como el grado de concordancia entre los resultados obtenidos en mediciones repetidas de un mismo mensurando bajo unas condiciones establecidas. La precisión se expresa habitualmente en términos de imprecisión y se computa como la desviación estándar de los resultados de la prueba.

La precisión puede estudiarse bajo condiciones de repetibilidad, de reproducibilidad e intermedias.

- **Las condiciones de repetibilidad**, son aquellas condiciones en las que los resultados de una medición se obtienen con el mismo método, en muestras idénticas, con el mismo operador, utilizando el mismo instrumento de medida, durante un corto intervalo de tiempo y sin calibraciones entre las mediciones.
- **Las condiciones de reproducibilidad**, son aquellas condiciones bajo las que los resultados se obtienen con el mismo método, el mismo mensurando, en laboratorios diferentes, en diferentes equipos y con operadores distintos
- **Las condiciones intermedias**, son las condiciones, que como su nombre indica, se encuentran entre las de repetibilidad y las de reproducibilidad

De manera que repetibilidad y reproducibilidad son dos condiciones extremas de la precisión. La primera describe la mínima y la segunda la máxima variabilidad en los resultados.

#### a.1) Precisión intermedia

El estudio de la precisión intermedia es el que se realiza, como su nombre indica, bajo condiciones que se encuentran entre las de repetibilidad y las de reproducibilidad.

Existen muchos factores que pueden contribuir a la variabilidad de los resultados de un método de medida, sin embargo los cuatro factores que más influyen en la precisión son:

- **Tiempo:** el intervalo de tiempo existente entre las mediciones.
- **Calibración:** si se ha calibrado entre las mediciones.
- **Operador:** si siempre es el mismo operador o son diferentes operadores los que llevan a cabo las mediciones.
- **Equipo:** si se utiliza el mismo equipo (o el mismo o diferentes lotes de reactivos) en las mediciones.

El objetivo de la determinación de la precisión intermedia es medir la capacidad del método de medida para repetir los resultados de la prueba bajo condiciones definidas. Es importante definir las condiciones en las que se va a realizar la medición de la precisión intermedia indicando qué factores se han variado mediante sufijos por ejemplo:

- a) **S<sub>(T)</sub>:** Desviación estándar de la precisión intermedia obtenida de la realización de las mediciones en tiempos diferentes
- b) **S<sub>(O)</sub>:** Desviación estándar de la precisión intermedia obtenida con diferentes operadores.
- c) **S<sub>(TO)</sub>:** Desviación estándar de la precisión intermedia obtenida con diferentes operadores en tiempos diferentes.

Y podríamos seguir dando ejemplos de precisión intermedia, variando la calibración, etc.

El abordaje más sencillo para la determinación de la precisión intermedia en un único laboratorio es la realización de series de  $n$  mediciones variando algún factor entre las mediciones.

La ISO recomienda que el número de mediciones sea como mínimo de 15. Por ejemplo si únicamente variamos el factor tiempo, el estudio de la precisión intermedia consistiría en realizar la medición de la misma muestra en 15 días diferentes (realizando por ejemplo 3 replicados cada día). Y si el estudio fuese de repetibilidad, que sería el caso en el que los cuatro factores permanecen constantes, se realizarían 15 mediciones como mínimo de la misma muestra el mismo día.

Otros organismos como por ejemplo EURACHEM consideran que 10 mediciones son suficientes y el CLSI recomienda 20 aunque en la guía EP15-A del mismo organismo consideran suficientes 4 replicados en 5 días diferentes.

La **imprecisión intermedia del laboratorio**,  $S_L$ , se determina con la fórmula:

$$S_L = \sqrt{\frac{\sum_{d=1}^D (\bar{x}_d - \bar{\bar{x}}_D)^2}{D-1} + \left(\frac{n-1}{n}\right) \cdot S_r^2}$$

Donde:

“ $D$ ” es el número de días, “ $n$ ” el número de replicados por día,  $\bar{x}_d$  la media de los resultados de cada día,  $\bar{\bar{x}}_D$  es la media de las medias y  $x_d$  los resultados de cada día “ $d$ ”.

La desviación estándar de las medias al cuadrado ( $B^2$ ) es el primer sumando de la raíz cuadrada antes indicada:

$$B^2 = \frac{\sum_{d=1}^D (\bar{x}_d - \bar{\bar{x}}_D)^2}{D-1}$$

Por lo tanto, la desviación estándar de las medias de cada día sumada cuadráticamente a la repetibilidad con un factor de ajuste  $(n-1)/n$ , corresponde a la imprecisión intermedia del laboratorio

$$S_L = \sqrt{B^2 + \left(\frac{n-1}{n}\right) \cdot S_r^2} = \sqrt{\frac{\sum_{d=1}^D (\bar{x}_d - \bar{\bar{x}}_D)^2}{D-1} + \left(\frac{n-1}{n}\right) \cdot S_r^2}$$

y la **variabilidad intraserial** ( $S_r$ ):

$$S_r = \sqrt{\frac{\sum_{d=1}^D \sum_{i=1}^n (x_{di} - \bar{x}_d)^2}{D(n-1)}}$$

## a.2) Repetibilidad

El estudio de la repetibilidad tiene menos importancia, sin embargo puede ser útil para controlar el correcto funcionamiento del equipo instrumental y de algún proceso del procedimiento analítico.

Para una estimación del mismo puede utilizarse una mezcla de sangres o, incluso, el propio material utilizado como control interno que tiene la ventaja de poderse reproducir

fácilmente en cualquier momento y de disponer de varias concentraciones. Por lo tanto, no es necesaria la utilización de material de referencia para esta determinación.

$$CV(\%) = \left[ \frac{S_r}{\text{media}} \right] \times 100$$

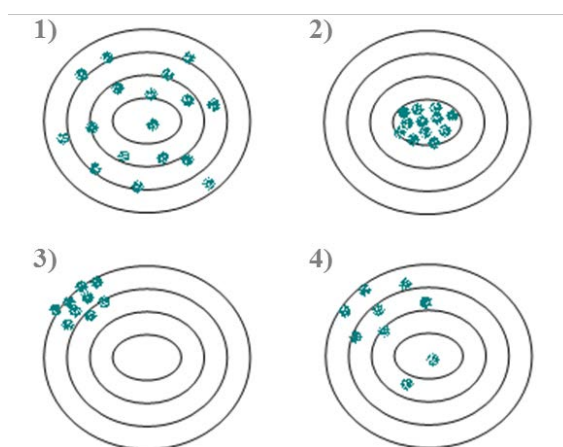
### a.3) Exactitud

La SFSTP, ICH y EURACHEM, incorporan la terminología de la ISO, que define el término exactitud como el grado de concordancia entre el resultado de una medición y el valor de referencia aceptado.

Esencialmente, la exactitud es la ausencia de error. Un método no es exacto si los resultados que proporciona no son precisos. En conjunto ambos términos, precisión y veracidad, describen la exactitud de un método.

$$\text{Exactitud} = \text{Veracidad} + \text{Precisión}$$

$$LC_{95\%} = x \pm t \frac{u}{\sqrt{N}}$$



- (1) Gran cantidad de errores aleatorios. No existen errores sistemáticos
- (2) Pocos errores aleatorios. No existen errores sistemáticos—EXACTO: PRECISO Y VERAZ
- (3) Pocos errores aleatorios. Gran cantidad de errores sistemáticos
- (4) Gran cantidad de errores aleatorios. Gran cantidad de errores sistemáticos

#### 1.5.4.- LÍMITE DE DETECCIÓN

El límite de detección (LD) de un método es una característica de su resolución que debe quedar reflejada en la validación de un ensayo, de acuerdo con las normas ISO 17025 y la ISO 15189 para la acreditación, para acreditar la competencia de los laboratorios de ensayo y clínicos, respectivamente.

Se trata de la confirmación y provisión de evidencias objetivas de que se cumplen los requisitos para poder usar el método con el fin de informar resultados clínicos.

En un sentido amplio, el límite de detección es la más pequeña cantidad o concentración de analito que puede ser distinguida con fiabilidad del cero (IUPAC 2002).

A pesar de lo aparentemente simple del término, se encuentra sujeto a muy diferentes interpretaciones y diferentes formas de abordar su estimación (IUPAC 2002).

Para estimar el Límite de Detección multiplicamos la desviación estándar (S) por 3,3 y la dividimos por la media de las pendientes ( $\bar{m}$ )

#### 1.5.5.- LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN

El límite de cuantificación (LC) es la menor cantidad real de analito que puede detectarse con fiabilidad y en la cual el error total cumple las metas del laboratorio para exactitud. Dependiendo del requisito de error definido, el LC puede ser igual al LD o muy superior, pero nunca inferior. Es, por lo tanto, la mínima concentración de analito que puede ser determinado en un tipo de muestra determinada con una determinada precisión y exactitud (AOAC 1998) (EURACHEM 1998) (ICH 2005) o con una determinada incertidumbre (EURACHEM 2002) (IUPAC 2002). El laboratorio tiene que establecer sus metas de incertidumbre en las medidas de baja concentración, y permitir al médico solicitante interpretar si es adecuado para el uso que pretende. A veces se establece arbitrariamente un valor de imprecisión para el LC del 10% (IUPAC 2002) (IUPAC 1995).

Su estimación generalmente se realiza multiplicando 10 veces la desviación estándar en el blanco (AOAC 1998), (IUPAC 1995), (ICH 2005).



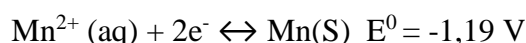
## 2.- PARTE GENERAL

### 2.1.- ASPECTOS INORGÁNICOS DEL Mn

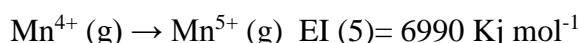
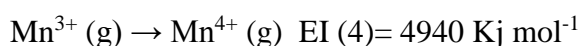
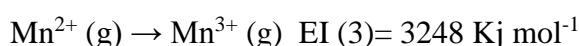
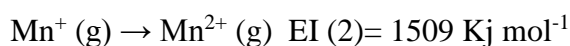
El Mn es un metal de la primera serie de transición situado en el grupo 7 de la tabla periódica, de número atómico 25 y masa atómica 54,938.

#### Propiedades físicas y características:

- **Configuración electrónica:** [Ar]4s<sup>2</sup>3d<sup>5</sup>
- **Aspecto físico:** Es de color blanco grisáceo y duro
- **Punto de fusión:** 1519 K
- **Punto de ebullición :** 2235 K
- **Entalpía de atomización estándar:** 283 kJmol<sup>-1</sup>
- **Potencial de reducción estándar (298K):**



- **Energía de ionización para las 5 primeras ionizaciones:**



- **Radio metálico:** 137 pm
- **Resistividad eléctrica:** 143 (ρ) x 10<sup>8</sup>/Ω m (a 273k).
- **Estructura:** los átomos están dispuestos en una **red cúbica compleja**
- **Polimorfismo:** El **Mn α** adopta una red compleja, el **Mn β** presenta una estructura algo más sencilla que contiene dos ambientes con número de coordinación 12, el **Mn γ** posee una estructura cúbica compacta (ccp) distorsionada y el **Mn σ** adopta una red cúbica centrada en el cuerpo (bcc).
- **Redes iónicas:** El compuesto MnO tiene una estructura de la sal de roca (**NaCl**). La pirolusita (**MnO<sub>2</sub>**) adopta estructura de rutilo (**TiO<sub>2</sub>**).

- **Color:** el color de los compuestos de metales del bloque d es un rasgo característico de especies con una configuración electrónica en el estado fundamental distintas de  $d^0$  y  $d^{10}$ . Por ejemplo,  $[\text{Mn}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$  es de color rosa pálido; el hecho de que el color observado sea de baja intensidad se debe a que el color se origine por transiciones electrónicas «d-d». Los colores pálidos indican que la probabilidad de que ocurra una transición es baja. El color intenso de especies como  $[\text{MnO}_4]^-$  tiene un origen diferente, concretamente absorciones o emisiones de transferencia de carga.
- **Paramagnetismo:** La existencia de compuestos paramagnéticos de metales del bloque d es frecuente y surge de la presencia de electrones desapareados.
- **Formación de complejos:**

Los iones de metales del bloque d forman complejos fácilmente y su formación va acompañada a menudo por un cambio de color y, a veces, un cambio en la intensidad del color.

**Estados de oxidación variables:** El Mn puede donar 7 electrones de su capa más externa y alcanzar 8 estados de oxidación distintos (0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 y 7). En el medio ambiente los más importantes son:  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{4+}$ , y  $\text{Mn}^{7+}$ . En los tejidos vivos el Mn se ha encontrado como  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{3+}$  y posiblemente  $\text{Mn}^{4+}$  [4].  $\text{Mn}^{5+}$ ,  $\text{Mn}^{6+}$ ,  $\text{Mn}^{7+}$  y otros complejos de Mn de alto estado de oxidación generalmente no se encuentran en materiales biológicos.

- **Números de coordinación:**

Para los complejos de metales del bloque d, el *modelo de Kepert*, considera que el metal está situado en el centro de una esfera y los ligandos son libres de moverse por la superficie de la esfera. Se considera que los ligandos se repelen entre sí; sin embargo ignora los electrones no enlazantes. Así considera que la geometría de coordinación de una especie del bloque d es independiente de la configuración electrónica en el estado fundamental del centro metálico y, por tanto, iones del tipo  $[\text{ML}_n]^{m+}$  y  $[\text{ML}_n]^{m-}$ ,  $[\text{ML}_n]$  tienen la misma geometría de coordinación.

## 2.2.- DISTRIBUCIÓN Y USOS

El Mn es el duodécimo elemento más abundante en la corteza terrestre y el tercer elemento de transición en abundancia. De los cerca de 300 minerales que lo contienen destaca su óxido más estable, la pirulosa ( $\beta$ -  $\text{MnO}_2$ ); de la cual se extraen anualmente millones de toneladas. También existen otros tipos de depósitos como las acumulaciones de carbonatos, que suelen estar compuestas por rodocrosita ( $\text{MnCO}_3$ ), y los depósitos estratiformes.

El Mn se recicla poco y se han descubierto nódulos de Mn que contienen hasta un 24% del metal en el fondo del océano.

La principal fuente de Mn de la población es a través de la dieta, pero la exposición a Mn en humanos puede ocurrir a través del medio ambiente.

El principal uso del Mn es la industria del acero como reactivo para reducir el oxígeno y el azufre, y como agente de aleación para la fabricación de aceros especiales. Los aceros de alto contenido en Mn (hasta 12%) poseen una resistencia muy elevada al choque y al desgaste y son adecuados para maquinaria de prensar, moler, excavar y vías férreas.

En la industria química se utiliza como agente oxidante y para la producción de permanganato potásico y otros productos químicos derivados del Mn.

El Mn forma diversos compuestos organometálicos, el de mayor interés práctico es el metilciclopentadienil manganeso tricarbonilo  $\text{CH}_3\text{C}_5\text{H}_4\text{Mn}(\text{CO})_3$ , que suele denominarse MMT, se ha utilizado como aditivo del fuel-oil, como inhibidor de humos y como antidetonante de gasolinas.

El Mn también se emplea en la fabricación de cerámicas, cerillas, vidrio y tintes. Algunas sales de Mn se utilizan como fertilizantes, secantes para el aceite de linaza, fabricación de vidrio, decolorante de textiles y curtido de las pieles.

## 2.3.- FUNCIONES BIOLÓGICAS DE Mn

### 2.3.1.- ESENCIALIDAD DEL Mn

El Mn es considerado un nutriente esencial en humanos y animales.

Se requiere como catalizador para una importante variedad de reacciones enzimáticas implicadas en el metabolismo y síntesis de neurotransmisores [5], formación ósea, formación del tejido conectivo, metabolismo de proteínas, metabolismo de hidratos de

carbono, metabolismo de lípidos, regulación metabólica, sistema inmune, reproducción y coagulación sanguínea. [6], [7].

El Mn está incorporado en el centro activo de varias metaloenzimas:

- Arginasa
- Glucosiltransferasa (importante en la síntesis de proteoglicanos)
- Glutamin sintetasa
- Fosfoenolpiruvato carboxilasa
- Isocitrato deshidrogenasa
- Superóxido dismutasa (Mn –SOD): principal agente destoxicante de especies reactivas de oxígeno en las mitocondrias [8].

El Mn tiende a formar complejos con otras sustancias por lo que se encuentra libre a muy bajas concentraciones en plasma y tejidos [9]. Cuando el Mn se encuentra en altas concentraciones en los tejidos, sobre todo en el cerebro, puede producir toxicidad. Exposiciones a niveles altos de Mn durante el desarrollo fetal pueden producir déficit neurocognitivo, mientras que en adultos la acumulación de Mn en los ganglios basales puede conducir a un síndrome llamado manganismo, el cual presenta muchas similitudes con la Enfermedad del Parkinson (EP) [10].

No existen recomendaciones formales de los requisitos diarios de Mn, pero se ha establecido de 2 a 5 mg/día la ingesta adecuada y segura para adultos [11].

### **2.3.2.- FISIOLÓGÍA DE LA ABSORCIÓN, METABOLISMO Y EXCRECIÓN**

Los seres humanos mantienen una concentración estable de Mn en los tejidos, esto es posible gracias a un estricto control homeostático de la absorción y la excreción. Se calcula que la carga total de Mn en el organismo oscila entre 10 y 20 mg para un varón de 70 kg. La semivida biológica del Mn es de 36 a 41 días, pero en el caso del Mn depositado en el cerebro, es considerablemente mayor.

Está bien establecido que la exposición a altas concentraciones de Mn por vía oral, parenteral o por inhalación ambiental conduce a elevaciones de la concentración de Mn en los tejidos.

### 2.3.2.1.- ABSORCIÓN

En situaciones laborales, el Mn se absorbe principalmente por **inhalación**, la absorción de Mn a través de la piel puede considerarse despreciable.

El MnO<sub>2</sub> y otros compuestos de Mn utilizados y producidos como subproductos volátiles del proceso de refinado del metal son prácticamente insolubles en agua, por este motivo, sólo llegan al torrente sanguíneo las partículas suficientemente pequeñas para alcanzar el alveolo pulmonar. Las partículas de mayor tamaño inhaladas pueden ser depuradas por las vías respiratorias o deglutidas.

El Mn también puede llegar al aparato digestivo a través de los **alimentos** o del **agua contaminada**, sin embargo el riesgo de intoxicación por esta vía no es grande. En adultos sanos menos del 5% del Mn ingerido oralmente es absorbido. [12]. La absorción en los niños es mayor que en los adultos, particularmente en el periodo neonatal [13]. En niños alimentados con lactancia artificial la retención del Mn es un 20% de la ingesta oral. El cerebro infantil capta en el primer periodo neonatal un 8% del Mn ingerido.

El **sexo** es otro factor determinante en la absorción del Mn, en mujeres parece ser mayor que en hombres. Los hombres contiene una concentración sérica de ferritina mayor que las mujeres y se ha encontrado una asociación inversamente proporcional entre la ferritina plasmática y la absorción de Mn [14]. El Mn inhibe la absorción del hierro [15] y tiene una vida media más larga en hombre que en mujeres [16].

Las principales estimaciones de la absorción se han hecho basándose en las curvas de retención corporal total, 10 a 20 días después de dosificar con Mn. Usando este método se estima que la absorción media a partir de una comida test que contiene 1 mg de Mn es de  $1,35 \pm 0,51$  % en hombres y  $3,55 \pm 2,11$ % en mujeres [16].

Para una comida que contiene de 0,3 a 0,34 mg de Mn la absorción es de  $5 \pm 3,1$ % , 10 días después de la administración a una mujer joven [17], y si se mantienen 30 semanas los aportes, la absorción se reduce de un 30 a 50% de la que se había observado en sujetos no suplementados [18].

Algunos estudios indican que el Mn es absorbido a través de un mecanismo de transporte activo [19], pero la difusión pasiva ha sido sugerida a partir de estudios que indican que la absorción del Mn ocurre por un proceso no saturable [20].

### 2.3.2.2.- TRANSPORTE

Tras inhalación o administración parenteral u oral, el Mn absorbido se elimina rápidamente de la sangre y es captado por el hígado para a continuación ser transportado a los tejidos extra hepáticos unido a la **transferrina** [21],  **$\alpha_2$  – macroglobulina** [22] y **albúmina** [23].

Los patrones cinéticos para el aclaramiento hemático y la captación hepática del Mn son similares, lo que indica que ambos depósitos de Mn tienden a equilibrarse rápidamente.

El Mn se acumula en los tejidos ricos en mitocondrias y atraviesa la barrera hematoencefálica y placentaria. El exceso de metal se puede distribuir en los riñones, intestino delgado, glándulas endocrinas y huesos. También se han observado concentraciones más elevadas de Mn en las zonas más pigmentadas del organismo, como son la retina, la conjuntiva pigmentada, la piel morena y el pelo negro.

### 2.3.2.3.- EXCRECCIÓN

La **bilis** constituye la principal vía de excreción de Mn , más del 90% del Mn se elimina en las heces , por lo tanto el riesgo potencial de intoxicación por Mn es superior en aquellas circunstancias en las que la excreción biliar se encuentra disminuida, como sucede en los neonatos o en los enfermos hepáticos [24], ya que esto puede contribuir a un incremento de Mn liberado en el cerebro y otros tejidos [8].

Pacientes con atresia biliar presentan hipermanganesemia sin ningún incremento de la ingesta de Mn en la dieta [25].

La concentración plasmática de Mn se eleva en niños con colestasis hepática que reciben suplementos de Mn en soluciones de nutrición parenteral [26].

No está claro que los niños puedan mantener la homeostasis de Mn. Ratones neonatos fueron incapaces de mantener la homeostasis hasta los 17 o 18 días de vida [27].

Sólo entre un 0,1 y 1,3% de la ingesta diaria de Mn se elimina por vía urinaria. La excreción urinaria de Mn parece no estar influenciada por la ingesta de Mn en la dieta [23].

En otros estudios se ha encontrado que la excreción urinaria está entre el 0,05 y el 0,15 % de la ingesta [28].

En un estudio de equilibrio de 5 hombres sanos , la excreción urinaria varió de 0,04 a 0,14% de su ingesta, y su concentración en la orina disminuye durante las fases de depleción del estudio [29]

Tras la exposición al compuesto orgánico MMT, la excreción del Mn se produce mayoritariamente por la orina. Este hecho se ha explicado como resultado de la biotransformación del compuesto orgánico en el riñón.

### **2.3.3.- TRANSPORTE DEL Mn EN EL SNC**

El Mn entra en el sistema nervioso central (SNC) principalmente a través del endotelio capilar a concentraciones normales de Mn en plasma, mientras que a altas concentraciones de Mn en plasma el transporte a través de los plexos coroideos parece ser el predominante [30], [22].

En un estudio se ha observado que Mn marcado radiactivamente, inyectado en el torrente sanguíneo, se concentra en los plexos coroideos una hora después de la inyección y tres días después es localizado en la circunvalación dentada y CA3 del hipocampo [31].

El manganismo es una condición asociada con exposiciones a altos niveles de Mn, y se asocia a altos niveles de Mn en el cerebro, principalmente en aquellas áreas que contienen altas concentraciones de Fe no hemo, especialmente el caudado-putamen, globo pálido, sustancia negra y núcleo subtalámico.

Parece que el Mn es transportado a través de la barrera hematoencefálica (BHE) por diferentes tipos de mecanismos:

- **Mecanismos de difusión facilitada** [22]
- **Transporte activo** [22], [32], [30].
- **Transporte mediado por el transportador 1 de metales divalentes (DMT-1)**, también conocido como DCT-1/NRAMP2. [33], [34]
- **Transportador SLC30A10** [35], [36]
- **Complejo receptor transferrina/ transferrina** [35]
- **Ca<sup>2+</sup>- ATPasa de vías secretoras: SPCA1, SPCA2** [35]
- **Transportador ATP13A2** [35]
- **Ferroportina (SLC40A1)** [35]

- **Transportadores de metales familia ZIP: ZIP-8 y ZIP-14** [32], [35], [37]
- **También existe vías de fuga** en aquellas zonas que carecen de barrera hematoencefálica como los órganos circumventriculares.

#### **2.3.3.1.- TRANSPORTADOR SCL30A10:**

El reciente descubrimiento de SLC30A10 como transportador crucial de Mn en los seres humanos ha arrojado más luz sobre el transporte Mn través de la célula.

Mutaciones en el gen SLC30A10 causan un trastorno hereditario autosómico recesivo en el metabolismo del Mn, produciendo toxicidad en el SNC [35].

El estudio de un paciente con deficiencia en el transporte de Mn debido mutaciones homocigotos del gen SLC30A10, desde los 14 años hasta su muerte a los 38 años, mostró pérdida neuronal en los ganglios basales, pérdida de mielina y astrocitos, depósitos de rodamina positivos y espongiosis. La proteína SLC30A10 se redujo en los ganglios basales de las neuronas residuales y se observó una despigmentación de la sustancia negra y otros núcleos de tronco cerebral [36]

#### **2.3.3.2.- TRANSPORTADOR TRANSFERRINA:**

En el plasma aproximadamente el 80% del Mn está unido a globulinas y albúmina. Una pequeña fracción de  $Mn^{3+}$  está unido a transferrina (Tf) [38].

Hay muchas teorías y alguna evidencia experimental que sugiere que la Tf, la principal proteína transportadora de Fe, es el principal mecanismo de transporte de Mn a través de la barrera hematoencefálica. En ausencia de Fe los sitios de unión a Tf pueden ser ocupados por otros metales, actuando así como transportador de los mismos. El complejo Mn-Tf está formado por una molécula de Tf con dos metales  $Mn^{3+}$  fuertemente unidos [38]. A concentraciones plasmáticas normales de Fe y Tf, solamente el 30% de los sitios de unión de la Tf están ocupados por el  $Fe^{3+}$ , por lo que la Tf tiene disponibles sitios de unión para el  $Mn^{3+}$ .

Los receptores de Tf están presentes en la superficie de los capilares cerebrales, donde se conoce que se produce la endocitosis de la Tf [39]. Esto sugiere que el  $Mn^{3+}$  entra en las células endoteliales unido a Tf, posteriormente es liberado del complejo en el interior de la célula endotelial por acidificación endosomal, retornando la Tf a la superficie luminal [40], [41]. El Mn liberado en las células endoteliales se une a la Tf cerebral para el



transporte extracelular y posteriormente es recogido por las neuronas, oligodendrocitos y astrocitos para su uso y almacenamiento. La endocitosis del complejo Fe-Tf mediada por receptores fue demostrada en células de neuroblastoma cultivadas [42], también se ha demostrado el transporte axonal anterógrado del Mn en las vías nigroestriatal y estriatonigral [43].

La administración intravenosa del complejo dextrano de hidróxido férrico inhibe significativamente la captación de Mn cerebral, y altas ingestas de Fe reducen las concentraciones de Mn en el SNC, corroborando la relación entre el Fe y el transporte de Mn [44].

El globo pálido, núcleo talámico y sustancia negra contienen las más altas concentraciones de Mn en el cerebro [45]. Estas áreas reciben información desde el núcleo accumbens, y el caudado-putamen dos áreas abundantemente ricas en receptores de Tf [46]. El hecho que las áreas de acumulación del Mn sean eferentes de áreas con alta densidad de receptores de Tf, sugiere que en estos sitios puede acumularse Mn a través de transporte neuronal [43].

#### **2.3.3.3.- TRANSPORTADOR DMT-1:**

Es el segundo transportador de Mn más importante después de la Tf, el DMT-1 es una proteína intestinal interluminal responsable de la regulación del Fe [47], [48]. El gen de transcripción para esta proteína está regulado por la concentración de Fe vía el elemento de respuesta al hierro (IRE) localizado en el mRNA [34]. Hay evidencia de que el DMT-1 tiene afinidad por el Mn y está involucrado en la entrega de Mn en el cerebro [49].

Estudios en ratones y en ratas de Belgrado fenotípicamente similares sugieren que un defecto el alelo DMT-1 afecta al metabolismo de Mn y Fe, y que ambos pueden compartir transportador DMT-1 en la barrera hematoencefálica [50]. El transporte de metal vía DMT-1 es un proceso activo probablemente dependiente de la temperatura, esto es interesante porque hay datos que sugieren que el transporte a través de células endoteliales de cerebro de rata (RBE4) en cultivo son dependientes de la temperatura, Fe y pH [51]. También se sabe que mutaciones en el NRAMP-2, el DMT-1 homólogo en bacterias y levaduras, interrumpe el transporte de Mn [52], [53].

Está claro que el DMT-1 no es el único transportador de Mn a través de la barrera hematoencefálica, ya que en las ratas de Belgrado el Mn es eficientemente transportado en el SNC [54].

Esto no es del todo sorprendente ya que muchos metales y otras moléculas dependen de numerosos transportadores y otras proteínas que facilitan su movimiento a través de varios sistemas barrera.

#### **2.3.3.4.- CITRATO:**

El complejo tridentado de citrato de Mn, con un carboxilato central no coordinado, es probablemente un sustrato para un transportador de aniones orgánico o un transportador de monocarboxilato (MCT). Candidatos para transportar citrato de Mn pueden incluir MCT y/o miembros de polipéptidos transportadores de aniones orgánicos (OATP) o la superfamilia ABC (ATP-binding cassette) [54], [55].

#### **2.3.3.5.- PROTEÍNAS TRANSPORTADORAS ZIP:**

La proteína transportadora ZIP, miembro de la familia de transportadores de metales SCL39 (solute-carrier-39), tiene 14 miembros ortólogos altamente conservados entre ratones y humanos [56].

En las plantas varias proteínas ZIP se han implicado en el transporte de metales divalentes incluyendo Zn, Fe y Mn.

Un estudio de un cultivo de fibroblasto fetales en ratones estableció que el ZIP8 tenía alta afinidad por el Mn [57]. Hay que tener cuidado en extrapolar estos resultados al campo animal. Son necesarios estudios para evaluar la función de estas proteínas (SCL39, MCT) en papeles fisiológicos.

#### **2.3.4.- EFECTOS CLÍNICOS DE LA INGESTA INADECUADA**

La deficiencia en Mn es rara [58], se caracteriza por defectos en el tejido conectivo, alteraciones en el metabolismo de lípidos y carbohidratos [59], fallo en el crecimiento, disminución de la formación ósea, osteoporosis [60], [61], defectos esqueléticos, reducción de la fertilidad, defectos al nacimiento, intolerancia a la glucosa, epilepsia e insuficiencia pancreática exocrina. Estados de Mn subóptimos también pueden causar la enfermedad de Perthe o fenilcetonuria en niños.

Deficiencias en el crecimiento y anormalidades óseas han sido observadas en animales que sufren una severa deficiencia en Mn [62].

Defectos en el metabolismo de la insulina materna podría también contribuir a los hallazgos encontrados, en que una dieta deficiente en Mn ha sido asociada con defectos en la síntesis de insulina en estudios animales [58].

Algunos estudios han observado que las concentraciones plasmáticas de Mn son menores en mujeres osteoporóticas, y que la densidad mineral ósea aumentaba cuando se aportaba una dieta enriquecida en elementos traza entre los que se encontraba el Mn [63], [64].

Hombres jóvenes sometidos a una dieta de depleción en Mn desarrollaron erupción eritematosa en el torso [65].

No existe ningún cuadro clínico claramente asociado al déficit de Mn en humanos. Existe algún caso descrito, como el de un hombre que estuvo privado de ingesta de vitamina K en un estudio experimental, e inadvertidamente la ingesta de Mn fue de 0,34 mg/día durante seis meses y medio, presentó síntomas de hipocolesterolemia, dermatitis escamosa, despigmentación y reducción de los factores de coagulación ligados a la vitamina K; los síntomas no desaparecieron al suplementar con vitamina K, pero cuando terminó el estudio se recuperó.

En el año 1987 se hizo un estudio de depleción de Mn con siete hombres jóvenes alimentándolos con una dieta purificada que contenía sólo 0,01 mg/día de Mn durante 10 días, y 0,11 mg/día durante 30 días [65]. Cinco de los siete individuos presentaron descamación y dermatitis mínimamente eritematosa que cubría el torso superior, que se diagnosticó como *miliaria cristalina o sudamina*, tras dos días de repleción las vesículas desaparecieron. Las concentraciones plasmáticas de colesterol estaban disminuidas, quizás porque el Mn es necesario en sus rutas biosintéticas.

Aparte de los casos inducidos experimentalmente, prácticamente no hay informes publicados de la deficiencia de Mn en hospitalizados y / o pacientes que reciben NP.

La preeclampsia aparece del 2 al 8 % de todos los embarazos y es una de las principales causas de mortalidad materna y parto prematuro en el mundo. Estudios han sugerido que las pacientes con preeclampsia tienen concentraciones **Mn**, Zn, Cu y Fe en sangre significativamente más bajas que los controles [66], [67].

Un estudio que analizó la implicación de los metales en la progresión de la enfermedad del Alzheimer, informó que el **Mn**, Zn y Se estaban disminuidos en pacientes con demencia [68].

### 2.3.5.- FACTORES QUE AFECTAN A LOS REQUISITOS DE Mn

#### 2.3.5.1.- ESTUDIOS DE EQUILIBRIO Y DEPLECCIÓN

**Las variaciones interindividuales** en la retención de Mn pueden ser grandes. 10 días después de administrar Mn en leche artificial a 14 niños sanos las retenciones de Mn oscilaban entre 0,6% y 9,2%. La retención media fue de  $2,9 \pm 1,8\%$  [69].

La **variación intraindividual** no fue tan grande, los valores de retención oscilaban entre  $2,3 \pm 1,1\%$  ,  $3,3 \pm 3,1\%$  y  $2,4 \pm 1,4\%$  para tres dosis repetidas en 6 sujetos [69].

Se ha estudiado la ingesta de Mn en la población Japonesa, en este estudio participaron 225 adultos con edades comprendidas entre los 30 y 69 años. La ingesta media de Mn fue de 4,9 mg/ día en mujeres y 5,1 mg/ día para hombre. El arroz blanco fue la principal fuente de aportación de Mn (20-30% del total de la ingesta) [70].

En un estudio, siete hombres sanos de edades comprendidas entre 19 y 22 años, fueron alimentados con una dieta baja en proteínas que contenía 0,01 mg/día de Mn durante 10 días, seguido de una dieta adecuada en proteínas que contenía 0,11mg/día de Mn 29 días más. Los autores estiman que el requerimiento mínimo de Mn fue de 0,74 mg/ día y estimaron un porcentaje de retención de Mn de 2,11 mg/día [65].

Cinco hombres jóvenes fueron alimentados con una dieta de comida ordinaria que contenía 1,21mg/día de Mn, suplementada con sulfato de Mn o placebo en las cenas, creando así cinco niveles diferentes de ingesta de Mn [29]. La ingesta total de Mn fue de 2,89 mg/día del día 1 al 20, de 2,06 mg/día de los días 21 al 42, de 1,21mg/ día de los días 43 al 80, de 3,79 mg/día de los días 81 a 91 (repleción), y 2,65 mg/día de los días 92 al 105. El equilibrio medio de Mn fue 0,083, -0,018, -0,088, 0,657 y 0,0136 mg/día, respectivamente.

Un estudio de equilibrio de 8 semanas [71] muestra que mujeres con edades comprendidas entre 20 y 42 años tuvieron un balance medio ligeramente positivo cuando consumían 2,5 mg/día de Mn.

En algunas chicas adolescentes se observó un balance negativo o ligeramente positivo cuando consumieron 3 mg/día de Mn [72].

Los estudios de equilibrio son problemáticos para investigar los requerimientos de Mn debido a la rápida excreción del Mn por la bilis y porque los estudios de equilibrio durante periodos de tiempo cortos o moderados de Mn no parecen ser proporcionales a la ingesta [11], [73].

Por esta razón algunos estudios han conseguido ampliar el rango de ingesta de Mn [16],[65].

#### **2.3.5.2.- BIODISPONIBILIDAD**

Algunos investigadores han observado que ingestas previas de Mn y otros elementos como el Ca, Fe, y P afectan a la retención del Mn [74] . Añadir calcio a la leche humana reduce significativamente la absorción de Mn de 4,9 a 3% [75].

Las concentraciones bajas de ferritina ya hemos expuesto que están asociadas a un aumento de la absorción de Mn. También se ha publicado que la presencia de fitatos reduce la absorción eficiente del Mn [76].

Un estudio evaluó la fracción biodisponible de Mn y otros tres micronutrientes esenciales en comidas para bebés. La biodisponibilidad del Mn fue menor del 50%. Las comidas para bebés basadas en carne y pollo presentaban una biodisponibilidad para el Mn de más del 50%, mientras las que estaban basadas en plátano tenían una biodisponibilidad menor del 50% [77] .

#### **2.3.5.3.- SEXO**

Los hombres absorben significativamente menos Mn que las mujeres y esta diferencia en la absorción puede estar relacionada con el estatus férrico, y la concentración de ferritina [16], [14].

#### **2.3.5.4.- CONCENTRACIÓN DE Mn EN LECHE HUMANA (LACTANCIA)**

Durante la lactancia se secretan unos 3 µg Mn/L en la leche, la mediana de las ingestas habituales de Mn es de 2,56 µg /día, esta cantidad parece ser suficiente para que no se observen deficiencias, aunque no hay datos que evalúen directamente las necesidades de Mn durante la lactancia.

Un estudio muestra que en el primer mes post parto la concentración media de Mn en leche fue de 4 µg/L y disminuyó a 1,87 µg/L a los 3 meses. [78].

Las ingestas observadas de Mn en niños mayores son marcadamente superiores a las de los niños menores, debido a la introducción de alimentos cuyo contenido en Mn es superior al de la leche.

**Tabla 2-1:** Ingesta adecuada para niños de 0 a 12 meses

Ingesta adecuada para bebés	
0–6 meses	0,003 mg/día de Mn
7–12 meses	0,6 mg/día de Mn

**Tabla 2-2:** Ingesta adecuada para niños de 1 a 18 años

Ingesta Adecuada para niños y niñas	
1–3 años	1,2 mg/día de Mn
4–8 años	1,5 mg/ día de Mn
Ingesta adecuada para niños	
9–13 años	1,9 mg/ día de Mn
14–18 años	2,2 mg/ día de Mn
Ingesta adecuada para niñas	
9–13 años	1,6 mg/ día de Mn
14–18 años	1,6 mg/ día de Mn

La concentración de Mn en leche de vaca se suele informar en un rango de 20 a 50 µg/L significativamente superior a la leche humana [79]. El Mn está presente en los glóbulos de grasa de la leche de vaca.

El porcentaje de Mn absorbido para leche humana (8,2%) es superior al de fórmulas de soja (0,7%) y fórmulas de leche de vaca (3,1%) [80].

#### 2.3.5.5.- INGESTA DE Mn EN ADULTOS.

El manganeso está presente en todas las dietas a bajas concentraciones. La principal ruta de entrada es mediante el consumo de alimentos, pero en cohortes ocupacionales, la exposición por inhalación no puede ignorarse.

- **Fuentes alimentarias:** Los cereales contribuyen a un 37% del Mn dietético, las bebidas como el té, los vegetales de hoja verde y las nueces contribuyen en un 20% y un 18% respectivamente.

- **Ingesta diaria:** Las medias observadas son de unos 1,6 mg/1000 Kcal. En hombres supone unos 3,4 mg/día y en mujeres 2,7 mg/día. Según el Total Diet Study la ingesta de Mn media para hombres fue de 2,1 a 2,3mg/día y la ingesta media para mujeres de de 1,6 a 1,8 mg/día.

**Tabla 2-3:** *Ingesta adecuada de Mn a partir de los 19 años.*

Ingesta adecuada para hombres	
19–30 años	2,3 mg/día de Mn
31–50 años	2,3 mg/día de Mn
51–70 años	2,3 mg/día de Mn
> 70 años	2,3 mg/día de Mn
Ingesta adecuada para mujeres	
19–30 años	1,8 mg/día de Mn
31–50 años	1,8 mg/día de Mn
51–70 años	1,8 mg/día de Mn
> 70 años	1,8 mg/día de Mn

- **Ingesta de suplementos:** Aproximadamente el 12% de los adultos consumen suplementos que contienen Mn. La media de la ingesta en suplementos es de aproximadamente 2,6 mg/día, una cantidad similar a la ingesta dietaria.
- **Embarazadas:**

Los requerimientos de Mn durante el embarazo se obtuvieron por extrapolación del grupo de chicas adolescentes y mujeres adultas descrito anteriormente. Se añadieron 16 kg al peso de referencia para estas mujeres citadas anteriormente obteniendo una ingesta adecuada de aproximadamente 2 mg/día.

**Tabla 2-4:** *Ingesta adecuada de Mn en el embarazo.*

Ingesta adecuada para embarazadas	
14–18 años	2 mg/día de Mn
19–30 años	2 mg/día de Mn
31–50 años	2 mg/día de Mn

○ **Lactancia:**

Aproximadamente 3 µg/L de Mn se segregan en leche humana, sin embargo los requerimientos no parecen ser muy superiores a los de las mujeres no embarazadas, se estima una ingesta media de 2,56 mg/día.

**Tabla 2-5:** *Ingesta adecuada de Mn en mujeres durante la lactancia.*

Ingesta adecuada para mujeres durante la lactancia	
14–18 años	2,6 mg/día de Mn
19–30 años	2,6 mg/día de Mn
31–50 años	2,6 mg/día de Mn

## 2.4.- TOXICIDAD

### 2.4.1.- EMBRIOTOXICIDAD

Se han observado efectos embriotóxicos y fetotóxicos en estudios animales, incluyendo un descenso en la talla y peso fetal de ratones preñados expuestos a Mn por vía intravenosa y subcutánea [81], [82].

Hay pocos datos epidemiológicos disponibles sobre los efectos de exposiciones de Mn en el útero de embarazadas. A diferencia de otros metales tóxicos como el plomo y el mercurio, los cuales no tienen beneficios para el cuerpo humano y producen efectos adversos en embarazadas [83], [84], [85].

Los efectos del Mn son los más complejos porque es a la vez un nutriente esencial y un potencial tóxico dependiendo de la cantidad expuesta.

Los niveles de Mn aumentan durante el embarazo siendo 3 veces superiores en mujeres embarazadas a término respecto a las no embarazadas. Esto refleja un aumento de los requerimientos de Mn para el desarrollo fetal.

Se ha observado una relación parabólica de U invertida entre los niveles de Mn en sangre materna durante el embarazo y el peso de los niños nacidos a término [86], [87] [88] [89], [90].

En un estudio se observa que el peso al nacer se incrementa hasta niveles de Mn en sangre materna de 41,8 µg/L, y se observa una ligera disminución del peso a concentraciones



mayores [91]. Una posible explicación sería el estrés oxidativo causado por altos niveles de Mn, conduciendo a un fallo en la función y crecimiento celular.

En otro estudio se encontró que valores extremos de la concentración de Mn en sangre materna (menores de 16,9 µg/L y mayores de 26,9 µg/L) se asociaban con un bajo peso al nacimiento [92]. Estos hallazgos sugieren que el Mn puede afectar al crecimiento fetal.

Varios mecanismos biológicos podrían explicar el bajo peso al nacer con los bajos niveles de Mn en sangre materna [93], ya que el Mn es un componente crítico de la matriz ósea y un importante cofactor de enzimas necesarias para el metabolismo óseo [61].

Una relación parabólica similar se encontró entre los niveles de Mn sangre materna y la actividad enzimática fetal, en un estudio de exposición a Mn [94].

Otros estudios encontraron niveles altos de Mn en el cordón umbilical comparados con los niveles de Mn en sangre materna [90], [95], [96].

No se observa una asociación entre el Mn en el cordón umbilical y el peso al nacer en algunos estudios, esto sugiere que el mecanismo implicado está relacionado con factores placentarios que regulan el crecimiento fetal en lugar de mecanismos celulares. Es necesaria más investigación para dilucidar la regulación y la transferencia placentaria del Mn durante el embarazo.

Se ha observado un incremento de la mortalidad infantil entre la población altamente expuesta a agua que contiene altos niveles de Mn [97].

Altos niveles de Mn en agua potable (> 300 µg Mn/L) están asociados con una reducción de la función intelectual en niños [98].

Por otro lado el riesgo de la neurotoxicidad producida por Mn durante el desarrollo cerebral tanto prenatal como posnatal ha recibido relativamente poca atención. Los experimentos más extensos de los efectos de Mn en el desarrollo cerebral se han llevado a cabo en roedores. Los roedores recién nacidos tienen un incremento del riesgo de neurotoxicidad por Mn comparado con los adultos debido a su capacidad de alcanzar altos niveles de Mn y dopamina cerebral después de la exposición [99], [100],[101]. Los procesos farmacocinéticos que pueden contribuir al aumento de la susceptibilidad neonatal animal al Mn incluyen: el incremento en la absorción en el tracto

gastrointestinal, la barrera hematoencefálica inmadura y la ausencia de mecanismos de excreción de Mn biliar hasta el destete [102].

Las concentraciones de Mn que son necesarias para el normal desarrollo cerebral fetal en las ratas, son más altas que en otros grupos de edad, lo que sugiere que se requiere Mn en altas cantidades durante la infancia, y que una suficiente cantidad de Mn es crítica para el desarrollo cerebral [31]. Por tanto los altos requerimientos de Mn en neonatos para un neurodesarrollo óptimo en comparación con los adultos no necesariamente deben ser considerados como una evidencia de toxicidad.

La exposición prenatal de manganeso puede afectar al desarrollo neurológico fetal e infantil, pero existen pocos estudios sobre la exposición a Mn en el útero. Se observa una asociación con forma de U invertida entre altas y bajas concentraciones de Mn en sangre materna y los índices de desarrollo mental y psicomotor de los niños [103]. Altas exposiciones prenatales al Mn se asocian con un pobre desarrollo neuroconductual [104].

Concentraciones placentarias de Mn elevadas pueden estar asociadas con un mayor riesgo de defectos en el tubo neural, espina bífida y anencefalia [105].

La exposición intrauterina a altos niveles de Mn medioambiental puede tener una asociación negativa con el neurodesarrollo a los dos años de edad [106].

Exposiciones prenatales a altos niveles de Mn se asocian con neurotoxicidad. Se sugiere que el Se tiene un efecto protector sobre el desarrollo del cerebro en los neonatos [107]

Algunos autores sugieren que un control anormal de la síntesis y función de hormonas tiroideas, puede ser la base de la neurotoxicidad asociada con exposición al Mn durante el desarrollo fetal, debido a que el Mn puede afectar a la homeostasis de las hormonas tiroideas y a procesos del desarrollo neuronal [10] bien por:

- Disregulación directa a nivel tanto de la glándula tiroides como de las hormonas tiroideas.
- O indirectamente a través de alteraciones en el control dopaminérgico de la glándula tiroides y sus hormonas

Algunos estudios concluyen que una deficiencia de hormonas tiroideas durante el desarrollo perinatal conduce a un déficit irreversible motor e intelectual [108] con cambios citoarquitecturales subyacentes [109].

## 2.4.2.- NEUROTOXICIDAD

La neurotoxicidad inducida por Mn fue primero identificada como un síndrome extrapiramidal conocido como **manganismo**, en mineros que han estado expuestos crónicamente a aerosoles y polvos que contienen altos niveles de Mn (>1-5 mg/m<sup>3</sup>). [45], [110], [111], [112], [113], [114], [115], [116], [117], [118].

La neurotoxicidad también ocurre por consumo de agua de pozo contaminada con altos niveles de Mn (1,8 a 14 mg/L) [119].

Se observan niveles cerebrales elevados de Mn, principalmente en aquellas áreas que contienen alta concentración de Fe no hemo, especialmente en el caudado-putamen, globo pálido, sustancia negra, y núcleo subtalámico.

Los altos niveles de Mn ,especialmente en la sustancia negra, se han asociado con el daño producido por especies reactivas de oxígeno dependientes de metal a las células dopaminérgicas contenidas en las estructuras cerebrales que controlan el movimiento muscular [120], [121]. La neurotoxicidad del manganeso ha sido atribuida a un defecto en la transmisión dopaminérgica, glutamatérgica y gabaérgica, disfunción mitocondrial, alteración en la producción de ATP, producción de especies reactivas de oxígeno, radicales libres, metabolitos tóxicos, depleción de los mecanismos de defensa antioxidantes, estrés oxidativo y neuroinflamación [122]. Como resultado de una acumulación de Mn en las células dopaminérgicas y en los ganglios basales, particularmente en el globo pálido, causando una disfunción motora extrapiramidal [35].

La toxicidad del Mn se asocia con una interrupción en el ciclo GABA-glutamato-glutamina entre astrocitos y neuronas, conduciendo a cambios en la transmisión gabaérgica y glutamatérgica y metabolismo de la glutamina [123, 124].

La exposición a concentraciones excesivas de Mn está asociada a una variedad de trastornos psiquiátricos y motores [125], [126], [127], [128], [129].

Los primeros signos de intoxicación por Mn pueden ser sutiles [110] y los test psicomotores pueden ser más sensibles que los exámenes neurológicos estandarizados para detectar los defectos en el SNC en los trabajadores expuestos [130].

Los signos y síntomas típicos que presentan los pacientes con manganismo se parecen aquellos que se presentan en la EP idiopática (temblor, rigidez, bradiquinesia, inestabilidad postural) [127] Los pacientes pueden presentar inicialmente palpitaciones,

dolor de cabeza, pérdida de memoria, temblor de las manos, mialgia de extremidades inferiores e hipermiotonía, [118] [131], [132]. Sin tratamiento normalmente los síntomas progresan. Pueden ocurrir también mareos, miastenia, entumecimiento de brazos y piernas. En casos graves, el paciente puede presentar temblores en el ángulo de los labios y en la punta de la lengua, lengua mordida mientras habla, temblor profundo en las extremidades superiores mientras escribe o transporta objetos, función anormal al apuntarse la nariz. Más típico es que se desarrolle una escritura irregular, dificultad para dibujar círculos, y las letras se vuelven progresivamente más y más pequeñas, y una distinta manera de andar.[111]. Los pacientes también pueden presentar dificultades neurológicas que incluyen apatía e incluso psicosis.

Otros estudios epidemiológicos de trabajadores de la industria han mostrado una correlación positiva entre la disfunción neurológica y el tiempo de vida de exposición al Mn [133], [134]. [130].Retirada la exposición ocupacional, las concentraciones de Mn en sangre, orina o pelo pueden volver a la normalidad después de varios meses. Algunos síntomas pueden estabilizarse o mejorar, sin embargo muchos de los síntomas que se asocian al daño extrapiramidal persisten. Los pacientes gravemente intoxicados tienen dificultades para hacer frente a la vida cotidiana.

La evaluación de la exposición al Mn no tiene un biomarcador ideal. La biomonitorización de Mn utilizando biomarcadores no invasivos (Mn en sangre, pelo, vello axilar, uña y saliva) fue capaz de detectar altos niveles de exposición, que se asocian con efectos neuropsicológicos perjudiciales en adultos expuestos a las emisiones industriales [135].

Una revisión investigó la asociación entre la exposición al Mn y el déficit de atención, desorden de hiperactividad en niños. Dos estudios indicaron que la exposición a Mn de los niños está relacionada con desórdenes de hiperactividad. El impacto en el desarrollo neurológico de los niños necesita ser más investigado [136]. Pocos estudios han considerado la influencia del sexo en el desarrollo neurológico en niños expuestos a Mn. Debido a que el estudio de la susceptibilidad al Mn respecto el sexo sigue siendo demasiado escaso para sacar conclusiones definitivas. Estudios epidemiológicos ambientales deben ser diseñados para cuantificar las exposiciones y los resultados basados en el género, ya que esto puede proporcionar nuevos conocimientos sobre estrategias de prevención [137].

Exposiciones al Mn ambiental en la infancia se ha asociado con déficits en el desarrollo. Un estudio investigó la asociación entre bajos niveles de exposición al Mn y la escala de Bayley del desarrollo en niños de Montevideo entre 14 y 45 meses de edad, no encontrando una evidencia clara de la asociación entre las concentraciones de Mn en pelo y la escala de Bayley del desarrollo [138].

Se estudiaron a 1089 niños en Corea del Sur entre los 8 y 9 años de edad. Se encontró que el exceso de Mn en niños está asociado con baja puntuación en pensamiento, escritura y cálculo. En contraste bajas concentraciones de Mn en niños se asocian con puntuaciones en color más bajas en test de Stroop. Esto sugiere que el exceso o la deficiencia en Mn puede causar efectos nocivos en los niños [139].

Se estudiaron 109 niños Jamaicanos entre 2 y 8 años con trastornos del espectro autista y se compararon con niños sanos. Se encontró una diferencia no significativa ( $p=0,29$ ) entre la concentración de Mn en sangre y los trastornos del espectro autista [140].

Una revisión sistemática de artículos originales publicados entre los años 2000 y 2013 que evalúan los efectos que produce de la exposición pre y pos prenatal a Mn en el desarrollo neurológico y comportamiento de los niños. Sugiriendo que un incremento en el 50% de los niveles de Mn en el cabello de los niños podría estar asociado con un descenso en 0,7 puntos en el cociente intelectual de niños entre 6 y 13 años de edad. Hay evidencias que relacionan las exposición a Mn con el daño en el desarrollo neurológico, comportamiento, déficit de atención e hiperactividad de los niños [141].

Otra revisión de artículos publicados entre los años 2011 y 2012 sugiere una asociación inversa entre exposiciones a altos niveles de Mn con un bajo cociente intelectual en niños. También encontraron una asociación directa entre altos niveles de exposición al Mn y un aumento de las alteraciones motoras. Dos estudios mostraron una correlación entre altos niveles de Mn en agua y alteraciones en el comportamiento [142].

Varios estudios informan de las interacciones significativas entre metales relacionadas con la salud infantil. Dos estudios prospectivos encontraron efecto en la cognición de los niños a edades tempranas, expuestos simultáneamente a plomo y Mn. Esto sugiere que la interacción entre metales puede causar daños en la salud diferentes a la exposición única de un solo metal [143].

Se estudió a 79 niños que vivían en el distrito minero de Molango frente a 95 niños no expuestos a Mn. El grupo expuesto presentó altos niveles de Mn en sangre y cabello,

respecto al grupo no expuesto ( $p < 0,001$ ) así como efectos negativos en el aprendizaje y la memoria del grupo de niños expuestos al Mn respecto al grupo de niños control [144]

La evidencia sugiere que la neurotoxicidad del Mn parece estar asociada con alteración del metabolismo del Fe tanto a nivel sistémico como celular [145].

La deficiencia dietética de Fe tiene una alta incidencia en los niños paquistanés y puede estar asociada con un aumento de la absorción gastrointestinal Mn. En un estudio se ha observado que las concentraciones de Mn en sangre fueron significativamente más altas en niños con anemia por deficiencia de Fe y sólo deficiencia de Fe en comparación con los niños que tenían una concentración de Fe normal. Estos niños también presentaban una concentración de receptores solubles de Tf más alta que los niños con un estado de Fe normal [146]. Otros estudios también encontraron que la deficiencia en Fe aumenta los niveles de Mn en niños, probablemente por un incremento de la absorción de Mn, sugiriendo que los niños con anemia por déficit de Fe pueden estar en riesgo de toxicidad por Mn y esto puede conducir a problemas neuronales [147], [148].

Entre los soldadores profesionales las concentraciones en suero de ferritina y Tf están elevadas, mientras que los niveles de receptores de Tf están disminuidos respecto al grupo control. Los niveles de receptores de Tf en suero disminuyen cuando la concentración de Mn aumenta, esto sugiere que la exposición al Mn de los soldadores perturba la homeostasis del Fe en suero y las proteínas asociadas con el metabolismo del Fe [145], [149].

In vivo, las exposiciones a Mn en animales parece facilitar el paso de Fe de la sangre al LCR [150].

In vitro, el tratamiento de cultivos celulares con Mn promueve la sobrecarga celular de Fe [151], [152].

En humanos, una disfunción en el metabolismo del Fe se ha visto en pacientes con EP idiopática. Los altos niveles de Fe total, disminuyeron la ferritina. El estrés oxidativo asociado a Fe y el complejo-I mitocondrial anormal se han informados repetidamente post-mortem en la sustancia negra de pacientes con EP idiopática [153].

Por lo tanto la acumulación de Fe en áreas seleccionadas del cerebro, puede inducir a la generación de especies de oxígeno reactivas mediadas por Fe, produciendo un estrés oxidativo que puede conducir a la muerte celular neuronal.

#### **2.4.2.1.- NUTRICIÓN PARENTERAL**

Las NPT normalmente contiene Mn como parte de una concentración fija de suplementos de elementos traza (ET). Crece la preocupación de administración de Mn y otros ET como suplemento fijo en NPT en pacientes neonatos, pediátricos y adultos durante más de 30 días porque puede provocar toxicidad por sobreexposición crónica.

Más de 50% de pacientes sometidos a NPT domiciliaria aumentan los niveles de Mn en sangre, pudiendo producirse hipermanganesemia, la cual está asociada con complicaciones cerebrales y hepáticas [154].

El mecanismo de regulación intestinal normal en pacientes sometidos a NPT es eludido, y la cantidad de Mn liberado vía intravenosa es 100% biodisponible. La vía de eliminación hepatobiliar está normalmente dañada en la NPT asociada a estenosis biliar e ictericia obstructiva. Esto puede ser especialmente importante en lactantes alimentados con NPT, los cuales hacen pocas o nada de heces y además muestran signos de disfunción hepática y colestasis [8].

Dosis excesivas de ET, como el Mn, se asocian con colestasis hepática, y pueden conducir a síntomas que producen insomnio, dolor de cabeza, pérdida de memoria, rápidos movimientos de mano y pérdida de coordinación parecida a la EP [155]. Sin embargo no ha sido establecida una clara relación causa efecto entre la NPT asociada a colestasis y la neurotoxicidad asociada al Mn [156].

En Australia, se evaluaron los niveles de Mn en suero de 8 pacientes adultos sometidos a NPT durante 4 meses, para determinar si existe correlación con colestasis hepática. A los pacientes se les suministró una preparación comercial de elementos trazas que contenía 0,3 mg de Mn por día, 3 veces por semana. Se midieron los niveles en suero de ALT, GGT, bilirrubina, urea, creatinina y filtrado glomerular. La existencia de colestasis fue determinada por un gastroenterólogo experto. La mitad de los pacientes presentaron hipermanganesemia independientemente de la presencia de colestasis y / o duración de la NPT. Un paciente presentaba altos niveles de Mn en suero con un incremento leve de los enzimas hepáticos, dos pacientes presentaban descenso de Mn en suero con enzimas hepáticas normales y otro paciente presentaba niveles de Mn normales con evidencia de colestasis. Los suplementos de Mn se suspendieron en 3 pacientes con aumento de sus niveles en suero. En estos adultos no existe correlación entre aumento de Mn y colestasis.

Esta experiencia está apoyada por un estudio donde la colestasis no fue considerada un predictor significativo del estado del Mn en sus ensayos con 54 pacientes pediátricos en tratamiento con NPT. De 20 pacientes con colestasis, 13 tenían niveles de Mn normales, pero 13 de 21 pacientes con altos niveles de Mn no tenían colestasis [157].

No obstante hay recomendaciones en las que insisten que todo paciente pediátrico que desarrolle colestasis se le debe determinar los niveles de Mn regularmente, ya que varios estudios confirman el efecto acumulativo del Mn en pacientes sometidos en periodos largos a NPT [154], [158].

La inducción del estrés oxidativo por radicales libres se ha implicado como factor causante del daño neurotóxico asociado a exposiciones a Mn y a otros ETs. El Mn se acumula en los astrocitos, y los experimentos in vitro con cultivos de astrocitos pretratados con Mn reflejan que se inhibe el consumo de glutamina, y por lo tanto la expresión de RNA mensajero que codifica los transportadores de glutamina. La alteración en el ciclo glutamina/glutamato en astrocitos inducida por estrés oxidativo, puede ser el mecanismo clave de cómo el Mn ejerce su neurotoxicidad [159].

Australasia Society of Parenteral and Enteral Nutrition PN Guidelines, recomiendan 275 µg/día para adultos y 1 µg/kg/día para bebés y niños [160].

American Society of Parenteral and Enteral Nutrition (ASPEN) and European Society for Clinical Nutrition and Metabolism (ESPEN) recomiendan de 60-100 µg/día o 1 µg/kg/día para adultos con un máximo de 50 µg/día para niños que reciben NPT durante largo tiempo [161].

A parte de las dosis inapropiadamente altas, la contaminación por Mn de productos intravenosos es una preocupación. Durante más 20 años estudios de los Estados Unidos han demostrado que las soluciones de NPT sin suplementación con Mn puede contener 5-38 mg /L de Mn, en especial de soluciones de gluconato de calcio, sulfato de magnesio o cloruro potásico [162].

Otros estudios han informado de la contaminación con Mn de hasta 310 g/L en soluciones de aminoácidos y diversas fórmulas de NPT [163].

Más recientemente los investigadores japoneses estiman que sus pacientes con NPT recibieron hasta 6 g/día de Mn a partir de glucosa, aminoácidos , soluciones de electrolitos [164].



En un estudio aún tomando todas las precauciones para evitar contaminación por Mn se observaron niveles de Mn en un rango de 45 a 90 µg/L. 5 de 6 pacientes con NPT presentaban estos niveles de contaminación; además de 275 µg/día de Mn como parte de su NPT prescrita mostraban altos niveles de Mn en sangre hasta 33µg/L, con incrementos de pruebas de función hepática como GGT Y ALT, hasta que la NPT fue retirada [165].

Esta variabilidad, junto con la presencia de Mn ubicua en agujas y tubos hace difícil asegurar una ingesta constante y apoya el argumento que las dosis recomendadas todavía pueden ser excesivas.

La dosis óptima para suplementaciones en largos periodos de tiempo es probable que no sea más de 55 µg/día y 1µg/kg/día en bebés [165].

Esta recomendación también puede ser considerada como dosis máxima para enfermos críticos y otros con NPT a corto plazo, de 5 a 10 días, en los que la contaminación y acumulación de Mn es un problema menor. Desafortunadamente, en los países donde sólo las combinaciones de ET fijos están autorizados y los productos individuales de ET no están fácilmente disponibles, no es posible ajustar la concentración de Mn en la fórmula de NPT sin reducir los otros ET esenciales como selenio, zinc y cobre [166], [167].

En vista de los numerosos informes de toxicidad en los pacientes pediátricos y a largo plazo (> 14 días), hay una verdadera necesidad de reformular estos productos multi-ET con una concentración más baja de Mn y la fabricación de algunos productos que excluyen por completo Mn.

En la primera parte de una revisión progresiva de las Directrices del AuSPEN 1999 para la provisión de suplementos de micronutrientes en pacientes adultos que reciben nutrición parenteral [168], se recomienda reducir las dosis de Mn, Cu, Co y Mo y aumentar la dosis de Se en comparación con la Guía de 1999. Las formulaciones multitraza que existen actualmente son un obstáculo para llevar a cabo estas directrices.

#### **2.4.2.2.- INSUFICIENCIA HEPÁTICA**

Los pacientes con enfermedad hepática crónica presentan neurotoxicidad por Mn, probablemente porque su eliminación en la bilis está disminuida [169].

Esta disminución produce mayores cantidades de Mn circulante que acceden al cerebro vía la Tf. Las concentraciones de Mn en sangre total de pacientes con enfermedad crónica hepática son más elevadas (18,8 a 45 µg/L) que en personas sanas [24].

Se ha observado una concentración de Mn en sangre total de 18,2µg/L en pacientes con cirrosis respecto a un grupo de sujetos control que tenía 6,85 µg/L.[169].

#### **2.4.2.3.- ENCEFALOPATÍA HEPÁTICA CRÓNICA**

Encefalopatía hepática y encefalopatía porto-sistémica son términos usados indistintamente para describir un complejo síndrome neuropsiquiátrico asociado con daño hepático agudo o crónico, shunt porto-sistémico, o generalmente la presencia de ambos [170], [171].

La EHC consiste en manifestaciones neurológicas de curso crónico debido al compromiso del SNC, destacando los síntomas de deterioro cognitivo y alteraciones conductuales asociadas a trastornos del movimiento. De estas últimas manifestaciones se han descrito parkinsonismo [172], temblor postural y acción, mioclonías como la característica asterixis y la corea [173].

La fisiopatología de la EHC aún no está aclarada, se ha postulado que hay disfunción de la neurotransmisión dopaminérgica, glutamérgica y gabaérgica provocada por niveles tóxicos de amonio [170], [174]. La presencia de amonio también puede inducir una depleción dopaminérgica en los ganglios basales del SNC [175].

Sin embargo, también existe evidencia clínica que favorece un rol en su patogenia para el metal manganeso. Este metal es excretado mayoritariamente por vía biliar por lo cual al haber disfunción hepática o shunt portosistémico es posible que se produzca un aumento de sus niveles sanguíneos y depósito en el SNC. El Mn tiene una especial afinidad por el sistema extrapiramidal compuesto fundamentalmente por los ganglios basales[118]. El Mn sería neurotóxico ya sea a través de depleción de dopamina, daño excitotóxico mediado por glutamato o estrés oxidativo [176]. Una mayor actividad de los mecanismos encargado de neutralizar el amonio, como es la enzima glutamina sintetasa, presente en los astrocitos, aumenta la demanda de Mn a quién utiliza como cofactor , este hecho podría explicar estas lesiones en los ganglios basales y otras estructuras subcorticales [176].

Se han descrito la presencia de hiperintensidades simétricas en los ganglios basales visualizadas sólo en la secuencia T1 de la resonancia magnética de cerebro (RMN) en pacientes con fallo hepático crónico [172], [177], [178] .

Imágenes similares se han descrito en pacientes con atresia biliar, en sujetos sometidos a nutrición parenteral [179], y en personas con exposición ambiental a Mn [176].

La desaparición posterior de estas imágenes después de trasplante hepático, el cese del aporte de Mn parenteral y el tratamiento de la toxicidad respectivamente, han hecho postular que el depósito de Mn en el SNC sea el causante de estas lesiones [180], [181], [24], [182]

En 1995 se estudiaron 10 enfermos cirróticos en etapa avanzada a través de la determinación de niveles sanguíneos de Mn, haciendo una correlación con la intensidad de la señal en los ganglios basales, y comparándolos con sujetos control sin disfunción hepática. En 3 pacientes lograron además estudiar *post-mortem* la concentración tisular de Mn en los diversos núcleos basales. Se obtuvo una correlación directa entre la intensidad de señal en la RNM de cerebro y la elevación de niveles sanguíneos de Mn, determinando además una significativa elevación de la concentración tisular de Mn comparado con los sujetos control [176]

En otro estudio, a 77 pacientes con disfunción hepática crónica severa de distinta etiología y candidatos para trasplante hepático, se logró determinar la presencia de lesiones caracterizadas por su simetría sólo en la secuencia T1 y no en la correspondiente secuencia T2 de RMN en 75% de ellos y correlacionarlas directamente no sólo con la gravedad de la disfunción hepática sino también con la gravedad de la encefalopatía. Sin embargo, estas lesiones pueden ya estar presentes en etapas subclínicas, lo que ha sugerido su utilidad potencial como marcador radiológico precoz de la repercusión cerebral anticipando su aparición [180]

No está aclarado si estas hiperintensidades de las estructuras basales cerebrales en la EHC indican realmente una intoxicación crónica por Mn o son un reflejo de mecanismos de adaptación.

El análisis de la experiencia clínica comunicada en la literatura, favorece la hipótesis de que el metal manganeso se deposita en los ganglios basales en el SNC como consecuencia de una encefalopatía hepática o porto-sistémica, y que este metal pueda tener un rol en la patogénesis de este cuadro. La importancia potencial de esta asociación radica en la posibilidad del uso de terapia quelante como agente terapéutico para prevenir o lograr revertir las manifestaciones neurológicas de la EHC en forma similar a lo que ocurre por ejemplo con el uso de quelantes del cobre en la enfermedad de Wilson.

### 2.4.3.- DIAGNÓSTICO

Como ya se ha indicado anteriormente, el Mn es un elemento esencial, pero a altas de exposición conduce a un aumento de la concentración de Mn en el cerebro resultando un síndrome parecido al Parkinson.

**La enfermedad de Parkinson (EP)** es la segunda enfermedad degenerativa más prevalente y la neuropatología característica es la pérdida de neuronas dopamina nigroestriales en la sustancia negra pars compacta (SNpc), que conduce a los síntomas clínicos clásicos de la EP como temblor, hipoactividad, pérdida de equilibrio y bradiquinesia. Datos etiológicos y patológicos sugieren que tanto componentes genéticos como ambientales causan degeneración dopaminérgica [183].

Estudios en humanos, indican que la exposición crónica al Mn en ciertos trabajos puede aumentar el riesgo de adquirir o acelerar la EP [184], [185], [186].

**Los individuos con Parkinsonismo inducido por Mn** tienen más distonía y menos temblores que pacientes con EP idiopática [187], [188], [189], [190].

A pesar de que hay pocos estudios de muestras cerebrales humanas, hay una clara evidencia que los núcleos de los ganglios basales son el objetivo principal para la neurotoxicidad por Mn y que en su mayor parte la SNpc permanece intacta [191].

Los niveles de transportadores de dopamina se usan como marcadores de la integridad terminal dopamina en el diagnóstico de la EP [192].

El PET (positrón emission tomography) y SPECT (photon emission computed tomography) proporcionan una herramienta necesaria para visualizar y cuantificar la química del cerebro vivo.

La [18F]-fluorodopa PET proporciona una medida de la capacidad de las neuronas dopaminérgicas de sintetizar dopamina a partir de L-dopa, y representa una medida indirecta de la integridad neuronal dopaminérgica nigroestriatal.

La primera aplicación de PET para el estudio de la disfunción neurológica inducida por Mn fue realizada por un grupo conducido por el Dr. Donald Calne. Como se esperaba en este estudio, pacientes con EP presentaban un gran descenso de la actividad [18F]-fluorodopa en el cuerpo estriado relativa a los controles. Por otra parte, se midió actividad normal en trabajadores expuestos a Mn que presentaban signos clínicos de Parkinsonismo y elevados niveles de Mn en sangre y pelo. Por lo que se puede concluir que los

trabajadores expuestos a Mn tiene un sistema dopaminérgico nigroestriatal intacto y que los síntomas de Parkinsonismo pueden estar asociados a alteraciones en las neuronas del estriado postsináptico o pálido [193].

Otro grupo de trabajo también demostró que la [18F]-fluorodopa PET se reduce significativamente en pacientes con EP idiopática [194].

Estudios SPECT con radio ligandos transportadores de dopamina, han sugerido, que los transportadores de dopamina en el cuerpo estriado están disminuidos en pacientes con Parkinsonismo con una historia de exposición al Mn [195].

Un caso de una mujer con historia de cirrosis alcohólica, con síntomas de parkinsonismo, presenta en el MRI, acumulación de Mn en el ganglio basal. El incremento de los niveles de Mn observados en esta paciente fue debido al hecho que en la enfermedad hepática, la excreción biliar está alterada. La paciente presentaba disminución en [18F]-fluorodopa en el cuerpo estriado comparada con controles normales de la misma edad, pero no en el mismo grado que pacientes con EP. Este estudio también se complica por el hecho que esta mujer podía haber tenido EP con acumulación de Mn en los ganglios basales debido a su cirrosis hepática. Sin embargo la posibilidad que exposiciones al Mn acelere la progresión de la EP idiopática no se puede descartar, por lo tanto, la relación entre exposición al Mn y EP, sigue siendo un tema controvertido en la literatura en humanos [184].

La investigación sugiere que los sitios de lesión neurológica inducida por Mn son diferentes a aquellos observados en la EP idiopática. Las principales regiones cerebrales diana en el manganismo son el globo pálido y la corteza estriada del ganglio basal, mientras que la neurodegeneración en la EP idiopática ocurre principalmente en la sustancia negra [196], [197].

La diferencia en los lugares de la lesión patológica podría determinar las manifestaciones clínicas de manganismo o EP idiopática. La falta de respuesta de pacientes con manganismo a la terapia con L-dopa, un criterio que diferencia al manganismo de la EP idiopática, puede reflejar el lugar de lesión específico en el cerebro para el manganismo o EP idiopática, dando lugar a diferentes respuestas a la L-dopa. [115], [198].

Varias cuestiones cruciales sobre la toxicidad del Mn en humanos siguen sin resolver:

- Falta de una clara definición clínica para distinguir el manganismo de la EP idiopática.

- Falta de una estrategia terapéutica clínica exitosa para el tratamiento.

#### **2.4.4.- BIOMARCADORES DE EXPOSICIÓN A Mn.**

Debe hacerse hincapié, que los síntomas de intoxicación por Mn una vez establecidos normalmente se vuelven progresivos e irreversibles, lo que refleja en cierta medida el daño permanente de las estructuras neuronales. Por lo tanto, la búsqueda de un indicador biológico como marcador de la exposición temprana al Mn se ha convertido en una gran tarea para la investigación clínica de la neurotoxicidad del Mn.

##### **2.4.4.1.- Mn EN SANGRE:**

Del 60% al 80 % de Mn está contenido en las células rojas de la sangre [165]. El rango de referencia de la concentración de Mn es sangre total oscila de 3,93 µg/L a 11,39 µg/L [1].

La concentración de Mn en sangre depende principalmente de la concentración de Mn en la dieta y en menor medida de Mn inhalado si es en grandes cantidades.[199], [200].

La determinación de Mn es sangre total como indicador del estado de Mn supone una ventaja respecto a la de determinación de Mn en suero o plasma, evitando la interferencia por hemólisis, ya que la ligera hemólisis de las muestras de suero o plasma puede incrementar notablemente la concentración de Mn en estas muestras. Sin embargo también existe una gran desventaja en la de terminación de Mn en sangre total, ya que parece ser extremadamente variable.

En un estudio con depleción en Mn la concentración en sangre total fue de 9,57 µg/L (rango 5,40 µg/L a 7,57 µg/L) y al final 6,01 µg/L (4,43 µg/L a 7,57 µg/L) tras 39 días del periodo de depleción. Pero estas diferencias no fueron significativas. Con 10 días de repleción de Mn, la concentración de Mn en sangre total aumento a 6,99 µg/L (3,93 µg/L a 18,3 µg/L) [65].

Otro estudio examinó los niveles de Mn en sangre de la población general respecto al sexo, raza, edad, embarazo, menopausia en Estados Unidos. Participaron 7720 personas con edades comprendidas entre los 1 y 80 años. Los niveles de Mn en sangre estaban en un rango de 1 a 62,5 µg/L, con una media de 10,6 µg/L y 9,2 µg/L en mujeres y hombres respectivamente. Se encontró una asociación significativa entre altos niveles de Mn en sangre y: sexo femenino, edad joven, asiáticos y comienzo del embarazo. Hubo una relación no lineal entre los niveles de Mn en sangre y los niveles de Hg, Pb, Fe y Cd.

Estos resultados sugieren diferencias metabólicas relacionadas con el género en la regulación del Mn, un importante papel del Mn en la reproducción, y la necesidad de tomar en consideración las diferencias relacionadas con la edad y el sexo en los niveles de Mn en sangre así como el embarazo cuando se estudie la esencialidad o toxicidad de Mn [201].

Niveles de Mn elevados en sangre deben sugerir una reciente exposición al Mn.

#### **2.4.4.2.- Mn EN SUERO:**

La concentración de Mn en suero y plasma parece ser poco sensible a grandes variaciones en la ingesta de Mn.

Varios estudios informan que la concentración de Mn en suero y plasma responde a la ingesta dietética:

- La concentración de Mn en suero en mujeres que consumen 1,7 mg/día de Mn fue menor que las mujeres que ingieren 15 mg/día de Mn suplementario durante más de 20 días [202].
- En un ensayo de depleción las concentraciones de Mn en plasma fueron de 1,28 µg/L al inicio, las concentraciones fueron disminuyendo significativamente durante el segundo (0,95 µg/L), y tercer (0,80 µg/L) periodo de dieta con ingestas de Mn de 2,06 y 1,21 mg/día respectivamente. Los valores se incrementaron significativamente a  $1,11 \pm 0,35$  µg/L, cuando la dieta fue enriquecida con 3,8 mg/día de Mn. Durante el final del periodo de dieta la ingesta de Mn fue de 2,65 mg/día, y la concentración en plasma fue de  $0,97 \pm 0,33$  µg/L

Sin embargo en otros estudios se observa que la concentración de Mn en plasma no se correlaciona significativamente con los niveles de ingesta de Mn:

- En un estudio con 10 hombres que consumían de 0,52 a 5,33 mg/día de Mn, la concentración de Mn en suero no responde a la variedad de la ingesta dietética [203].
- La concentración individual de Mn en suero varía de 0,4 a 2,12 µg/L, con una media de 1,04 µg/L. Sin embargo la concentración de Mn en suero de 4 a 5 sujetos que consumen 15 mg de quelado de Mn como suplemento dietético durante 5 días fue de 1,48 µg/L, mientras que los sujetos control sin suplemento tenían una media de 1,1 µg/L [63].

Los niveles de Mn en suero pueden servir razonablemente bien como un indicador de la exposición reciente a Mn (por ejemplo soldadores respecto a personas normales). Un estudio a 97 soldadores profesionales reveló que las concentraciones de Mn en suero **no correlacionaban** con los años de exposición profesional de los soldadores, sin embargo estos soldadores mostraban niveles significativamente altos de Mn y Fe en suero respecto a los sujetos control [149].

#### **2.4.4.3.- Mn EN ORINA:**

La concentración de Mn en orina no es un buen biomarcador clínico de exposición a Mn, ya que la principal ruta de excreción del Mn es la bilis.

Se determinó la concentración de Mn en orina de 137 soldadores por ICP-MS, la concentraciones de Mn obtenidas estaban muy por debajo que los valores alerta recomendados por salud laboral, pero eran significativamente mayores a las concentraciones de la población no expuesta a Mn, lo que demuestra la absorción de Mn generado en los humos de las soldaduras. Los resultados demuestran el interés de control biológico para la evaluación de riesgos para la salud y se recomiendan medidas de gestión de riesgos para los soldadores [204].

De 8 pacientes chinos que recibieron tratamiento con EDTA, 5 tenían niveles de Mn urinario dos veces superiores que antes del tratamiento con EDTA [205], [111].

Por lo tanto algunos médicos han recomendado EDTA como un test de exposición al Mn, incrementos significativos de Mn en orina después de tratamiento con EDTA puede sugerir acumulación de Mn en el cuerpo.

Sin embargo se debe tener cuidado ya que no está claro si el EDTA moviliza el Mn fisiológico en individuos normales, por lo que en qué medida la elevación del Mn urinario se considera que reflejo de la sobrecarga de Mn en el cuerpo, ni que dosis de EDTA sería necesaria para evaluar una respuesta razonable.

#### **2.4.4.4.- Mn EN CABELLO**

Un estudio encontró una concentración de Mn en pelo de niños que vivían cerca de una planta de ferroaleaciones más elevada en comparación con los controles ( $p < 0,001$ ). Estos datos muestran que la determinación de los niveles de Mn en el cabello, puede ser un biomarcador de la exposición medioambiental a Mn en niños [206].



#### **2.4.4.5.- MRI:**

La exploración del cerebro mediante MRI, se observa un incremento de la T1. La señal de Mn en el globo pálido se ha encontrado a menudo en trabajadores expuestos a Mn [111], en pacientes que reciben nutrición parenteral durante largo tiempo [207], y en casos clínicos de fallo hepático [208].

Soldadores con más de 10 años de exposición al Mn cuyas manifestaciones clínicas incluyen rostro impasible, temblores, bradiquinesia, alta intensidad de la señal en el globo pálido en la imagen T1. La intensidad, desaparece casi por completo 6 meses después de abandonar el trabajo, lo que conduce a los autores a concluir que la MRI, igual que las concentraciones de Mn en sangre, puede ser útil para detectar exposiciones recientes [209]

#### **2.4.4.6.- LINFOCITOS CON ACTIVIDAD MnSOD**

Se ha postulado que un buen biomarcador del Mn es sangre podría ser la medida de la actividad de la Mn superóxido dismutasa en las células sanguíneas mononucleares. Pero esta es una prueba que no se realiza en laboratorios clínicos habitualmente, sólo está disponible como prueba de investigación.

Los linfocitos con actividad MnSOD estaban elevados en 47 mujeres suplementadas con 15mg/día de Mn durante 90 días [202].

Otros factores como el etanol [210], y los ácidos grasos poliinsaturados [211], pueden afectar a la actividad MnSOD.

#### **2.4.5.- TERAPIA**

La falta de estrategias terapéuticas efectivas para el deterioro neurológico inducido por el Mn es un gran problema. Sin tratamiento, la gravedad de los síntomas normalmente aumenta, y la oportunidad de recuperación disminuye.

##### **2.4.5.1.- L-DOPA**

El tratamiento con L-dopa es la primera opción para la mayoría de los clínicos por dos razones:

- a. Los neurólogos tienden a controlar o aliviar los devastadores síntomas asociados con el daño extrapiramidal. Casos clínicos muestran que la

sustitución de la pérdida de dopamina podría inicialmente mejorar los síntomas extrapiramidales [212].

- b. Los neurólogos tienden a usar L-dopa como herramienta diagnóstica para distinguir entre manganismo y EP idiopática. La evidencia apoya la idea que la terapia con L-dopa generalmente tiene limitados beneficios en la mejora de los síntomas clínicos en los pacientes con manganismo, los cuales contrastan con la respuesta de los pacientes con EP idiopática.

#### **2.4.5.2.- EDTA**

En los casos graves de envenenamiento por Mn, la terapia de quelación se ha recomendado con el fin de reducir la carga corporal de Mn. El EDTA (ethylenediamine tetra acetic acid) es normalmente usado como agente quelante para el tratamiento de una gran variedad de intoxicaciones producidas por metales, como por ejemplo en plomo, y se ha demostrado que aumenta la eliminación de la toxina, reduciendo la carga corporal de Mn, y por lo tanto demostrando su utilidad en el tratamiento de pacientes con manganismo en estadios tempranos del desarrollo de la enfermedad [213]. Los cuatro grupos carboxilos en la estructura del EDTA, su esencialidad, y su propiedad quelante, hacen a la molécula pobremente lipofílica, y por lo tanto evita que atraviese barrera hematoencefálica. El EDTA probablemente es el quelato principal de los iones de Mn extracelulares [214].

Entre siete soldados chinos con manganismo, el tratamiento con EDTA, aumento la excreción de Mn por la orina y disminuyó la concentración de Mn en sangre [205].

Otros investigadores han informado de una conclusión similar para el uso de la terapia con EDTA, , aunque cuestionan la eficacia de este tratamiento para reducir los síntomas neurológicos [215], [114].

#### **2.4.5.3.- PAS**

Un fármaco antibacteriano, el PAS (sodium para-aminosalicylic acid), se ha convertido en un fármaco potencialmente beneficioso para el tratamiento de manganismo grave. El PAS es un fármaco aprobado por la Agencia Americana del Medicamento (FDA) para el tratamiento de la tuberculosis.

Clínicamente el fármaco nunca ha sido considerado como un fármaco quelante para el envenenamiento por metales, además el grupo carboxilo junto con los grupos hidroxilo y

amino, no parecen ser un quelante ideal para la mayoría de los metales. Hay evidencias recientes de que la quelación del Fe en individuos con un exceso de carga de hierro puede reducir la viabilidad y la replicación de la tuberculosis [216], lo cual puede en parte contribuir a la eficacia del PAS en el tratamiento de la tuberculosis.

Los primeros casos humanos que usaron PAS con éxito en el tratamiento del manganismo fueron presentados en la literatura inglesa [217].

En el 2004 este grupo de investigadores realizó un estudio de seguimiento a uno de los dos casos informados en 1992, combinado con 85 casos que habían recibido tratamiento con PAS, la mayoría de los cuales procede de la literatura china. Los datos clínicos parecen apoyar la eficacia de PAS en el tratamiento del manganismo. . La infusión intravenosa de PAS, alivia la mayoría, si no todos, los signos y síntomas, sorprendentemente hace revertir el síndrome extrapiramidal inmediatamente después de la terapia y asegura un pronóstico estable durante largo tiempo después de la terapia sugiriendo que posiblemente repara daño neuronal [218].

El mecanismo exacto de la terapia con PAS sigue siendo desconocido. Basado en las características de la estructura química y mejor lipofilia, el PAS puede penetrar la barrera hematoencefálica más rápidamente que el EDTA.

## **2.5.- NUTRICIÓN INFANTIL**

### **2.5.1.- LACTANCIA NATURAL**

La composición de la leche humana es compleja, la concentración de algunos nutrientes puede diferir entre las mujeres, la duración de la lactancia, hora del día y edad materna; mientras que la concentración de otros nutrientes es relativamente constante [219].

Aunque existe cierta variabilidad, el contenido de energía de la leche humana es de aproximadamente de 0,67 Kcal/ml.

Los componentes individuales de la leche humana y las formas en que contribuyen a satisfacer las necesidades nutricionales de los bebés nacidos a término se discutirán a continuación:

**A. NITRÓGENO:** El contenido de nitrógeno se divide en proteínas y compuestos de nitrógeno no proteico:

- 1 **Proteínas:** Representan sólo el 0.9% del contenido de la leche materna pero proporciona alrededor del 8% de las necesidades calóricas de los recién nacidos a término y aseguran un estado de proteínas adecuada del lactante durante el primer año [220].

El contenido de proteínas en la leche de las madres de los recién nacidos a término es aproximadamente 2,3 g /dL [221]. La concentración de proteínas se reduce entre las dos y cuatro semanas a un nivel constante de aproximadamente 1,8 g /dL [221], [222].

Las principales proteínas son: caseína, albúmina,  $\alpha$ -lactoalbúmina,  $\beta$ -lactoalbúmina, lactoferrina, inmunoglobulinas y lisozima.

Aproximadamente el 70 % de las proteínas en la leche humana están en la fracción de suero de leche soluble ( $\alpha$ -lactoalbúmina, albúmina, lactoferrina, inmunoglobulinas y lisozima), y el 30 % en la fracción de caseína insoluble. En contraste, la proteína de leche bovina contiene 18 % de suero de leche y 82 % de caseína [223].

La alta proporción de proteínas de suero en la leche humana es beneficioso para los niños porque son más fácilmente digeridas, se asocian con un más rápido vaciado gástrico [224] y proporciona concentraciones más bajas de aminoácidos potencialmente deletéreos (fenilalanina, tirosina, y metionina). [225], [226], [227].

Además, la leche humana tiene mayores niveles de cistina (necesario para sintetizar el glutatión antioxidante) y taurina (necesario para la conjugación de bilis y el desarrollo del cerebro ) que la leche bovina [228].

La principal proteína del suero humano es lactoalbúmina. En la leche bovina, la principal proteína de suero de leche es lactoglobulina , lo que puede contribuir a la alergia a la proteína de leche y cólicos [223], [229], [230].

La lactoferrina , lisozima, y la inmunoglobulina A secretora son proteínas específicas de suero humano que mejoran la defensa de acogida [231], [232], [233]. La leche bovina sólo tiene trazas de estas proteínas.

- 2 **Nitrógeno no proteico:** En la leche humana, representa aproximadamente 20 % del nitrógeno total. En contraste, la fórmula tiene menos del 5 % de nitrógeno no

proteico [223], [234]. Los principales compuestos de nitrógeno no proteico son nucleótidos, aminoácidos libres e urea.

**Los Nucleótidos:** representan del 2 al 5 % del nitrógeno no proteico de la leche humana y disminuyen en la leche bovina. Los nucleótidos son importantes para las funciones gastrointestinales, inmunológicas y metabólicas. [235], [236], [237].

**La Taurina** es el segundo aminoácido más común encontrado en la leche materna y no existe en la leche de vaca. Actúa de neurotransmisor o neuromodulador en el cerebro y la retina. Muchas compañías están añadiendo este aminoácido a las fórmulas actuales.

**La Carnitina** es vital para el catabolismo de los ácidos grasos de cadena larga.

- B. LÍPIDOS:** Son el segundo mayor componente de la leche materna. Representa aproximadamente el 50 % de las calorías en la leche humana, siendo la principal fuente de energía para el bebé y proporcionan los ácidos grasos poliinsaturados.

El contenido en lípidos y energía aumenta durante la lactancia. La leche humana facilita la absorción y digestión de lípidos por la organización compleja de los glóbulos de grasa [238] [239], [240], [241].

La leche humana es única en su contenido de ácidos grasos de cadena muy larga , tales como ácido araquidónico y ácido docosahexaenoico que se han asociado con la mejora de la cognición , el crecimiento , y la visión [242].

De los macronutrientes de la leche humana los lípidos son los que más varían en concentración [243]. El contenido de lípidos de la leche se eleva a lo largo de la lactancia [244], varía en el transcurso de un día, aumenta dentro de las comidas, varía de madre a madre [219] y tal vez con el grado de vaciado de mama [245]. El contenido total de lípidos de la leche humana no se ve afectada por la dieta materna, aunque puede ser correlacionada directamente con la grasa corporal reservas maternas [246], [247].

**C. HIDRATOS DE CARBONO:**

El componente principal es la **lactosa** que refuerza la absorción de calcio y se metaboliza en galactosa y glucosa que suministran energía para el crecimiento. También se le ha atribuido una consistencia más suave de las heces, flora fecal bacteriana no patógena y la mejora de la absorción de minerales [248].

La leche humana también contiene una pequeña proporción de oligosacáridos (hay 131 en la leche materna y sólo 10 en la leche de vaca), que ayudan el crecimiento del *Lactobacillus bifidus* lo que aumenta el movimiento intestinal, disminuye el crecimiento de patógenos y ayuda a bloquear la unión del antígeno al tracto gastrointestinal.

Los oligosacáridos, también son importantes en la defensa de las infecciones en niños ya que sus estructuras imitan los receptores específicos de los antígenos bacterianos.

#### **D. MINERALES Y ELEMENTOS TRAZA:**

Los principales minerales de la leche materna son: hierro, zinc, flúor, selenio, sodio, potasio, calcio, magnesio, fosfato, cloro y citrato.

Las concentraciones de calcio y fósforo en la leche materna son relativamente constantes a través de la lactancia, pero son significativamente más bajas que en la fórmula. A pesar de una menor concentración de minerales y el consumo, la acumulación mineral ósea y el estado de los lactantes alimentados con leche materna es similar a la de los niños alimentados con fórmula, debido a una mayor absorción (biodisponibilidad) durante el primer año de vida [249], [250].

La concentración media de Mn en leche materna es de 4 µg/L y disminuye a 1,87 µg/L a los 3 meses. [78].

En la leche humana, los minerales están unidos a proteínas digeribles y también están presentes como complejos o en estados ionizados, haciéndolos más fácilmente biodisponible que en la leche bovina [251].

En un estudio, el seguimiento a los ocho años de edad mostró que los niños que fueron amamantados en comparación con los no amamantados tenían significativamente una mayor masa ósea, y el efecto fue mayor en aquellos que habían amamantado durante más de 3 meses [252].

Aunque las concentraciones de hierro, zinc y cobre descienden durante la lactancia, las necesidades de estos nutrientes son generalmente adecuadamente satisfechas a través de los primeros seis meses de vida [253],[254].

Más allá de los seis meses de edad, el hierro y otros alimentos complementarios que contienen micronutrientes se deben introducir para evitar deficiencias en recién nacidos a término [255].

**E. VITAMINAS:** Estado de la vitamina materna afecta el contenido de vitaminas en la leche humana. Posibles deficiencias de vitaminas en los bebés alimentados con leche materna incluyen:

1. Las madres con dieta vegana puede ser deficientes en **vitamina B12** soluble en agua, que resulta en bajos niveles en la leche materna. Estas madres deben recibir suplementos de vitamina B12 o deben comer alimentos fortificados con vitamina B12.
2. La deficiencia de **vitamina K** es común en el recién nacido. Esto se debe al bajo contenido de vitamina K de la leche materna, la producción inadecuada de vitamina K por un hígado inmaduro, la ausencia de la flora bacteriana que producen vitamina K y la mala transferencia placentaria de la vitamina K. En los bebés alimentados con leche materna, las concentraciones plasmáticas de todos los factores dependientes de la vitamina K son aproximadamente el 20 por ciento de los valores de los adultos. Por lo tanto, la administración profiláctica de óxido de vitamina K1 se da a los recién nacidos inmediatamente después del nacimiento para prevenir con vitamina K la enfermedad hemorrágica del recién nacido.
3. El contenido de **vitamina D** en la leche humana es bajo. Los suplementos de vitamina D se deben proporcionar a los lactantes amamantados en forma exclusiva y a los lactantes no amamantados que no ingieren en una cantidad adecuada de leche fortificada con vitamina D al día.
4. La **vitamina A** es alta en el calostro, luego la concentración va disminuyendo en la leche madura
5. La **vitamina E** es alta en el calostro, previene la anemia hemolítica, la integridad del músculo y es también un importante antioxidante. Está recomendado que las madres tomen suplementos de vitamina E, ya que la concentración desciende en la leche madura.

## **2.5.2.- LACTANCIA ARTIFICIAL**

### **2.5.2.1.- REQUERIMIENTOS NUTRICIONALES**

Los requerimientos de energía promedio en bebés sanos son aproximadamente 110 Kcal/kg/día hasta el mes de edad, 95 Kcal/kg/día hasta los tres meses, y 80 Kcal/kg/día entre los seis y doce meses de edad. Para niños de tres años o más los requerimientos energéticos van desde 100 Kcal/kg/día en niños de tres años hasta de 40-50 Kcal/kg/día en adolescentes.

### **2.5.2.2.- COMPOSICIÓN:**

Las fórmulas para lactantes de 0 a 12 meses están diseñadas para ser similares a la leche materna, son bajas en densidad calórica, calcio y fósforo comparadas con formulas para niños y lactantes.

El contenido en Mn de estas fórmulas varía según el fabricante por ejemplo; El Enfalac Prematuros de Almirón: 31µg/100g, el FM 85 para prematuros: 100 µg/100g, Sanutri preterm: 140 microgramos/100g.

Estas fórmulas necesitan administrarse en volúmenes de 150 a 175 mL/kg/día para proporcionar los requerimientos de energía, vitaminas y minerales. Aquellos lactantes que necesitan recuperar peso estarán en el límite superior del rango. Para aquellos lactantes que aun así no cubran sus necesidades, necesitaran fórmulas más concentradas de 0,78 a 0,85 Kcal/g que garanticen una adecuada ingesta de energía, proteínas y minerales.

Los niños mayores de 6 meses ya se les administran una alimentación complementaria a la leche para satisfacer sus requerimientos nutricionales.

Después del año de edad, una variedad de fórmulas están disponibles, dependiendo de las necesidades de cada niño. Para niños de entre 1 a 10 años, las fórmulas contienen generalmente una mayor concentración de micronutrientes comparadas con las fórmulas de adultos. Para niños mayores de 10 años, normalmente ya pueden usar las fórmulas diseñadas para adultos.

Fórmulas concentradas proporcionan una densidad calórica de hasta 2 Kcal/mL, y pueden ser útiles en algunos niños con una elevada necesidad calórica y baja tolerancia a fluidos. Sin embargo estas fórmulas son hiperosmolares y pueden producir diarrea y síndrome de



Dumping si no se suministran líquidos rápidamente o una depleción del volumen intravascular si los fluidos adecuados no son suministrados.

### **2.5.3.- NUTRICIÓN PARENTERAL EN NEONATOS**

La nutrición parenteral consiste en la provisión de nutrientes mediante su infusión en una vía venosa a través de catéteres específicos. Cuando constituye el único aporte de nutrientes se llama nutrición parenteral total.

Sus objetivos son promover la retención de nitrógeno y el ahorro de proteínas, aportar energía para los procesos metabólicos y establecer el crecimiento y la maduración durante el periodo postnatal crítico

En general está indicada para prevenir o corregir los efectos adversos de la malnutrición en pacientes que no son capaces de obtener aportes suficientes por vía oral por un periodo de tiempo superior a cinco a siete días. Por el contrario no está indicada en pacientes con capacidad intestinal adecuada.

Tabla 2-6: Indicaciones de la nutrición parenteral

Patología	Cuadro clínico
<p><b>Indicaciones digestivas</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Patologías neonatales, congénitas o adquiridas</li> <li>• Malabsorción</li> <li>• Otras causas</li> </ul> <p><b>Indicaciones extradigestivas</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Prematuridad</li> <li>• Hipercatabolismo</li> <li>• Fallo visceral</li> <li>• Cáncer</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Resecciones intestinales</li> <li>• Íleo meconial, atresia intestinal</li> <li>• Gastrosquisis, onfalocele</li> <li>• Enfermedad de Hirschprung</li> <li>• Hernia diafragmática</li> <li>• Pseudoobstrucción intestinal</li> <li>• Enterocolitis necrotizante</li> <li>• Diarrea grave prolongada</li> <li>• Síndrome de intestino corto</li> <li>• Enterostomía proximal</li> <li>• Fístulas</li> <li>• Linfagiectasia intestinal</li> <li>• Ciertas inmunodeficiencias</li> <li>• Enteritis por radiación</li> <li>• Enfermedad inflamatoria intestinal</li> <li>• Pancreatitis aguda grave</li> <li>• Ascitis quillosa, quilotórax</li> <li>• Grandes quemados</li> <li>• Politraumatizados</li> <li>• Gran cirugía</li> <li>• Trasplante de órganos</li> <li>• Caquexia cardíaca</li> <li>• Insuficiencia hepática o renal aguda</li> <li>• Mucositis grave.</li> </ul>

La nutrición parenteral no debería instaurarse por periodos inferiores a una semana y debe mantenerse hasta que se consiga la transición a la alimentación enteral, cuando esta vía solucione los 2/3 de los requerimientos nutricionales estimados.

### 2.5.3.1.- COMPOSICIÓN DE LA NUTRICIÓN PARENTERAL

#### A. Líquidos y electrolitos

Los requerimientos varían con la edad, el peso, el estado de hidratación y la enfermedad de base. Hay que tener siempre en cuenta las condiciones que pueden modificar estos requerimientos aumentándolos como por ejemplo la fiebre, los vómitos o la diarrea o disminuyéndolos como en el caso de la insuficiencia renal o los edemas.

**Tabla 2-7:** *Requerimientos basales de líquidos y electrolitos.*

Líquidos		
Recién nacidos: 40 -60 ml/kg/día (el primer día) hasta 150 – 180 ml/kg/día		
Lactantes, niños: Primeros 10 kg 100 ml/kg		
Electrolitos	RNPT (por kg. y día)	Lactante (kg/día)
Sodio (mmol)	3 - 6	2 - 4
Potasio (mmol)	1 – 3	2 -3
Cloro (mmol)	2 -3	2 -3
Acetato (mol)	1 -4	1 -4

Para controlar los fluidos aportados se registra el peso del recién nacido una vez al día si el peso es inferior a 1000 g dos veces al día. Se realiza un balance urinario (24 ml/kg/día) y la densidad de la orina (1,004 – 1,008 g/l). En general si la ganancia de peso es mayor de 25 g/kg/día debe sospecharse retención de líquidos.

#### B. Aminoácidos

Los aportes recomendados para garantizar un crecimiento adecuado y un buen balance nitrogenado son de 3 g/kg/día para los recién nacidos pretérmino, 2,5 g/kg/día para los lactantes menores de 2 años. Se usan soluciones de aminoácidos cristalinos. Algunos aminoácidos como la taurina y la cisteína son especialmente esenciales en los neonatos y lactantes por lo que se recomienda usar soluciones de aminoácidos específicas para niños porque tienen un mayor contenido de estos aminoácidos y menor cantidad de los aromáticos y los sulfurados.

En caso de insuficiencia renal los aminoácidos se usan con precaución dependiendo de la amonemia, los electrolitos y del equilibrio ácido – base, no sobrepasando 1g/kg/día.

### C. Aportes energéticos

El cálculo de las necesidades energéticas necesita una estimación del gasto energético en reposo, puede hacerse por calorimetría indirecta o estimarlo a partir de fórmulas (OMS/FAO/ONU o las fórmulas de Schofield)

**Tabla 2-8:** *Requerimientos energéticos del recién nacido.*

Semana	Necesidades basales	Mantenimiento actividad
Primera	35 – 40 Kcal/kg/día	100 Kcal /kg/día
Segunda	45 – 50 Kcal/kg/día	120 Kcal/kg/día

### D. Hidratos de carbono

La glucosa es el único hidrato de carbono empleado en la nutrición parenteral de niños, se administra como dextrosa 8D-glucosa y proporciona 4 Kcal/gramo. Debe constituir del 50 al 60% del aporte calórico total.

Su aporte en pre términos debe ser progresivo para prevenir la hiperglucemia. Si aparece hiperglucemia (más de 125 mg/dL) se administra insulina, la incidencia es un 45% en recién nacidos de menos de 1000 g y de un 80% si el peso es inferior a 800 g. Si la glucemia es mayor de 160 mg/dL se recomienda 0,05 UI insulina/kg/hora.

No se debe pasar la capacidad oxidativa máxima que en recién nacidos es de 12,5 mg/kg/minuto. Entre 7 y 15 mg/Kg/min aumenta la lipogénesis, con más de 20 mg/Kg/min aparece infiltración grasa hepática.

### E. Lípidos

Su uso previene el déficit de ácidos grasos esenciales. Pueden administrarse en perfusión separada del resto de los nutrientes o en una mezcla con aminoácidos y dextrosa. Proporcionan habitualmente el 30% del aporte calórico total, pero en caso de necesidad pueden alcanzar el 50%.

En pediatría pueden usarse o triglicéridos de cadena larga al 20% o al 30%, mezclas físicas de triglicéridos de cadena larga y triglicéridos de cadena media al 50% y soluciones que contienen ácido oleico. El ácido linolénico debe suponer el 0,5% de las calorías totales y el linoleico el 3 – 5 %. Se añade 1 UI de  $\alpha$  tocoferol por gramo de ácido graso insaturado para evitar la peroxidación lipídica. También se aporta carnitina.

## F. Minerales

Las cantidades totales de calcio y fósforo están limitadas por su solubilidad, el empleo de fuentes orgánicas de fosfatos (glicerofosfato sódico) ha permitido aportar mayores cantidades de calcio y fósforo con bajo riesgo de precipitación.

**Tabla 2-9:** Necesidades de calcio, fósforo y magnesio (por kg y día)

	RNPT	RNT	< 1 año
<b>Calcio (mg)</b>	40 – 90	40 – 60	20 – 25
<b>Fósforo (mg)</b>	40 – 70	30 – 45	10 – 30
<b>Magnesio (mg)</b>	3 – 8	3 – 6	3 - 6

## G. Vitaminas

La nutrición parenteral debe contener vitaminas hidro y liposolubles. La carnitina, transportador de los ácidos grasos de cadena larga puede considerarse esencial en el neonato porque su capacidad de síntesis está inmadura. No existe un acuerdo unánime sobre su inclusión en las soluciones de nutrición parenteral.

**Tabla 2-10:** Requerimientos diarios de vitaminas en unidades/kg/día

	RNPT	RNT
<b>Vitamina A (UI)</b>	1500	2300
<b>Vitamina E (mg)</b>	2,8	7
<b>Vitamina K (mg)</b>	80	200
<b>Ascórbico (mg)</b>	25	80
<b>Vitamina D (UI)</b>	160	400
<b>Tiamina (mg)</b>	0,35	1,2
<b>Riboflavina (mg)</b>	0,15	1,4
<b>Niacina (mg)</b>	6,8	17
<b>Pantoténico (mg)</b>	2	5
<b>Biotina (mg)</b>	6	20
<b>Vitamina B12 (mg)</b>	0,3	1
<b>Folato (mg)</b>	56	140
<b>Piridoxina (mg)</b>	0,18	1

## H. Oligoelementos

Es una práctica clínica estándar añadir suplementos de metales traza (zinc, cobre, selenio, cromo y manganeso) a los niños que reciben nutrición parenteral.

Existen ciertas variaciones en función de las unidades de cuidados intensivos, esta suplementación suele ser de unos 5,0 a 7,5  $\mu\text{g}$  de manganeso /kg de peso del niño. La retención del Mn intravenoso es de prácticamente el 100 %.

Actualmente existe una creciente inclinación a pensar que la administración de cantidades estándar de Mn provoca toxicidad neonatal [165].

**Tabla 2-11:** *Requerimientos diarios de oligoelementos (mg/kg/día)*

OLIGOELEMENTO	RNT (D.D.R.)
<b>Zinc</b>	130
<b>Cobre</b>	25
<b>Selenio</b>	6
<b>Cromo</b>	0,2
<b>Hierro</b>	140
<b>Selenio</b>	6
<b>Molibdeno</b>	No establecida
<b>Yodo</b>	5
<b>Flúor</b>	38

En la nutrición parenteral no sólo está esquivado el control de la absorción intestinal, sino que además es frecuente la disfunción hepática y la colestasis.

Respecto al manganeso, en 1985 la Academia Americana de Pediatría recomendaba aportes de 2 a 10  $\mu\text{g}$  de Mn/Kg/día en niños con alimentación exclusiva parenteral. Sin embargo estas recomendaciones se han revisado en 2003 y la recomendación es de 1  $\mu\text{g}$ /kg/día. El informe de la A.S.P.E.N. de 2004 también recomendaba 1  $\mu\text{g}$ /kg/día para niños pretérmino de menos de 3 kg así como para neonatos de entre 3 y 10 kg de peso al nacer.

El uso de preparados comerciales con cantidades fijas de Cu, Zn, Mn y Cr limita la flexibilidad necesaria en ciertas situaciones clínicas como la colestasis o el déficit de hierro en poblaciones particularmente vulnerables como los neonatos.

### 2.5.3.2.- ACCESO VASCULAR

La nutrición parenteral puede administrarse a través de una vía venosa periférica o de un catéter venoso central.

Las complicaciones hepatobiliares son la causa principal de preocupación en las nutriciones en periodos de más de 3 meses. Van desde la elevación de las enzimas hepáticas hasta la esteatosis o la evolución a una cirrosis y un fallo hepático. La prevalencia es muy variable según las series, y su etiología no está bien definida. Los factores asociados a la afectación hepática relacionada con la nutrición parenteral se dividen en tres grupos:

1. derivados de la alteración de la función intestinal secundaria a la ausencia de estímulos enterales.
2. componentes de la nutrición parenteral que actúen como tóxicos para el hígado o la ausencia de determinados nutrientes que ocasionen afectación hepática
3. la contribución de la enfermedad de base.

Cuando aparece una bilirrubina directa superior a 2 mg/dL durante un periodo largo y persiste la necesidad de nutrición parenteral es necesario descartar otras causas de afectación hepática y luego minimizar los factores de riesgo.

Si la enfermedad hepática progresa puede llevar a una cirrosis y obligar a la realización de un trasplante hepático.

Se han descrito alteraciones de las pruebas de función hepática entre el 20 y el 90 % de los pacientes que reciben nutrición parenteral. Es más frecuente en niños que en adultos.

**Tabla 2-12:** Factores asociados con la afectación hepática asociada a la NPT

<b>A. Factores relacionados con la enfermedad de base</b> <ul style="list-style-type: none"><li>○ Prematuridad y bajo peso</li><li>○ Sepsis</li><li>○ Síndrome de intestino corto</li><li>○ Sobrecrecimiento bacteriano</li><li>○ Falta de estímulo enteral</li></ul>
<b>B. Consecuencias del uso de la nutrición parenteral</b> <ul style="list-style-type: none"><li>○ Falta de estímulo enteral</li><li>○ Sobrecrecimiento bacteriano</li><li>○ Activación del proceso hepático</li></ul>

**C. Factores relacionados con la nutrición parenteral**

- Excesivo aporte calórico
- Lípidos
- Aminoácidos
- Carnitina
- Colina
- Fitosteroles

**Prematuridad y bajo peso**

En un estudio realizado en 1997 se relaciona la colestasis con la prematuridad, se habla de que el 50% de los prematuros con menos de 1000 g la presenta, mientras que solo aparece en el 7% de los que pesaban más de 1500. El peso más bajo se asocia también a una mayor inmadurez hepática con menor efectividad para la circulación entero hepática.

**Aporte excesivo**

Si las calorías suministradas son altas, se produce un aumento de la lipogénesis y un uso alterado de los lípidos que provoca esteatosis.

Los aminoácidos en exceso pueden tener un efecto sobre la membrana canilicular, reducir el flujo biliar y la excreción de aminoácidos.

**2.5.3.3.- MONITORIZACIÓN DE LA AFECTACIÓN HEPÁTICA**

Es frecuente encontrar un aumento de las enzimas hepáticas en las primeras semanas de uso de la nutrición parenteral. Los marcadores de colestasis que se elevan antes son GGT > fosfatasa alcalina > ácidos biliares > bilirrubina. La fosfatasa alcalina y la GGT son las más específicas en el paciente adulto. La elevación aparece al inicio de la segunda semana, las transaminasas lo hacen más tarde. En la mayoría de los casos estas elevaciones se resuelven al suspender la nutrición. La prevalencia en niños está valorada en algunos estudios en un 65 % de los neonatos con nutrición parenteral presentan elevaciones de la bilirrubina directa de más de 2 mg/dL, de ellos un 15% evoluciona a fallo hepático [256].

**2.5.3.4.- TOXICIDAD EN PACIENTES CON NPT**

En la actualidad existe un argumento convincente para no añadir rutinariamente Mn de aditivos en NPT, como se ha expuesto anteriormente en el capítulo de neurotoxicidad.



Se recomienda la determinación de Mn en sangre, en combinación con la RMN para motorizar la posible contaminación con Mn.

Las directrices de posología y las formulaciones de ET necesitan revisión, ya que las directrices internacionales actuales todavía pueden ser excesivas para NPT a largo plazo.

Las formulaciones con ET múltiples en dosis fijas restringen las opciones de prescripción y hacen que sea difícil de ajustar los niveles de Mn sin reducir los otros ETs esenciales.

Los fabricantes deberían reformular estos productos multi-ET con un menor y/o cero contenido en Mn y ofrecer productos individuales de elementos traza.

Todos los productos de NPT deben ser marcados con un nivel máximo permitido de ET.

La variabilidad en la práctica clínica requiere actualizaciones de las directrices de micronutrientes y reformulaciones para la NPT.

La escasez de evidencia de Mn asociada a la NPT, en combinación con el creciente cuerpo de evidencia de la toxicidad de Mn, lleva a concluir que no es necesario que el Mn se añada rutinariamente a los regímenes de NPT.

## **2.6.- ESPECTROSCOPIA DE ABSORCIÓN ATÓMICA**

### **2.6.1.- INTRODUCCIÓN**

**La espectroscopia atómica** se basa en la absorción, emisión o fluorescencia por átomos o iones elementales. Hay dos regiones del espectro que dan información atómica; la ultravioleta/visible y la de rayos X.

Los métodos espectroscópicos atómicos están entre los procedimientos analíticos más selectivos, y presentan también las ventajas de la rapidez y comodidad.

Hasta 1955 no se obtuvieron las primeras aplicaciones reales de la Espectrofotometría de Absorción Atómica (EAA) que fueron realizadas por Alan Walsh en Australia y Alkemade en Holanda

En el año 1954, en el Instituto de Física de Melbourne, en Australia, se realizó la primera demostración del equipo de absorción atómica que había diseñado. Desde ese año, la espectrofotometría de absorción atómica se ha desarrollado fundamentalmente en Australia, Estados Unidos, Inglaterra y Alemania.

La gran popularidad y el rápido desarrollo de esta técnica analítica se deben a las ventajas que ofrece:

- Puede analizar directamente 82 elementos
- Sus límites de detección son inferiores a la ppm
- Tiene una precisión del orden del 1% de CV
- Su manejo es sencillo

### 2.6.2.- FUNDAMENTOS FÍSICO-QUÍMICOS

Es con diferencia, la técnica más ampliamente utilizada para el estudio de especímenes biológicos.

**La espectroscopia de absorción atómica** se basa en la medida de la radiación absorbida por los átomos libres cuando se encuentran en su estado fundamental de menor energía.

En este estado cada átomo es capaz de captar un fotón de energía radiante pasando un electrón de su orbital más externo a un nivel mayor de energía. La cantidad de radiación de una determinada frecuencia absorbida depende del número de átomos en estado fundamental existentes que sean capaces de absorber esta misma frecuencia.

La proporcionalidad entre el número de átomos libres por unidad de volumen y la energía absorbida está regida por la **ecuación de Einstein**:

$$E_{abs} = B_{jk} * N * S_{\nu} * h * \nu_{jk}$$

Siendo:

**B<sub>jk</sub>** : coeficiente de probabilidad de absorción de Einstein para la transición j→k.

**B<sub>jk</sub> \* S<sub>ν</sub>**: fracción de átomos en estado fundamental capaces de absorber un fotón de energía por unidad de tiempo.

**S<sub>ν</sub>**: intensidad de la radiación espectral.

Como fundamento de la técnica de espectroscopia de absorción atómica, queda establecido que la energía absorbida depende de:

- la frecuencia de la línea de resonancia  $\nu_{jk}$
- la intensidad de radiación de dicha línea

La intensidad de radiación de la línea de resonancia no es constante, pues se produce un ensanchamiento de la línea de forma natural debido al efecto Doppler y al efecto Lorenz. Para conseguir que la energía absorbida sea proporcional al número de átomos presentes es preciso referirse a anchos de línea comprendidos entre **0,0005 nm y 0,005nm**.

Esta especificación afecta de forma definitiva al tipo de fuentes de emisión que se pueden usar en absorción atómica. Aunque las lámparas de espectro continuo producen una gran intensidad a lo largo de todo el espectro, es imposible separar una zona de 0,0005 nm. Es preciso por tanto, usar una fuente de radiación que emita el espectro del elemento analizado.

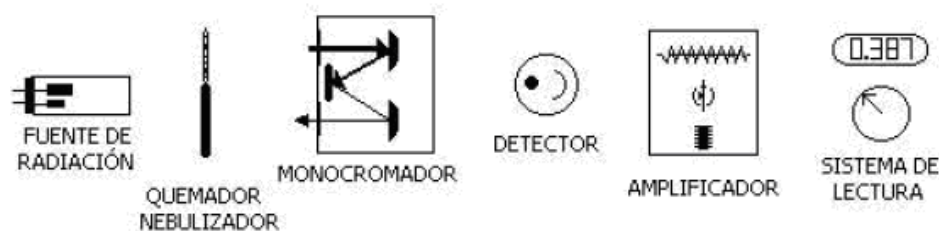
La medida de la absorbancia se basa en la ley de Lambert-Beer, siendo ésta proporcional a la concentración (C), a la longitud (l) y al coeficiente de extinción molar ( $\epsilon$ ):

$$A = C * l * \epsilon$$

### 2.6.3.- INSTRUMENTACIÓN

Esquemáticamente, un espectrofotómetro de absorción atómica dispone de una **fente de radiación** que incluya la longitud de onda de absorción, **un atomizador** como la llama o el horno de grafito, donde tiene lugar el proceso en el cual la muestra se convierte en vapor atómico, un **monocromador** que separa la línea de absorción, un **detector** que permita la lectura de la intensidad de radiación, seguido de un **amplificador** y **sistema eléctrico de lectura**.

*Ilustración 2-1: Esquema de un espectrofotómetro de absorción atómica*



#### 2.6.3.1.- FUENTES DE RADIACIÓN

Para que se cumpla ley de Beer es necesario que la anchura de banda de la fuente sea estrecha con respecto a la anchura de un pico de absorción.

Se necesita una lámpara distinta para cada elemento (o a veces grupo de elementos que se analiza).

Las fuentes de líneas más utilizadas son: **lámpara de cátodo hueco**, **lámpara de descarga sin electrodos** y **lámpara de vapor (Hg, Na)**.

- **Lámpara de cátodo hueco:** Es la fuente más común para las medidas de absorción atómica. Consiste en un ánodo de tungsteno y un cátodo cilíndrico, cerrados herméticamente en un tubo de vidrio lleno con neón o argón a presión de 1 a 5 torr. El cátodo está construido con el metal cuyo espectro se desea obtener, o bien sirve de soporte para una capa de dicho metal.

Cuando se aplica un potencial del orden de 300V entre los electrodos se produce la ionización del gas, lo que da lugar a una corriente de aproximadamente 5 a 20 mA al tiempo que los iones y electrones migran hacia los electrodos. Si el potencial es suficientemente grande, los cationes gaseosos adquieren la suficiente energía cinética como para arrancar algunos de los átomos metálicos de la superficie del cátodo y producir una nube atómica. Una parte de los átomos desprendidos se encuentran en estado excitados y de ese modo, al volver al estado fundamental emiten su radiación característica.

Al final, los átomos metálicos se vuelven a depositar difundiendo de nuevo hacia la superficie del cátodo o hacia las paredes de vidrio del tubo.

La eficacia de la lámpara depende de su geometría y del potencial aplicado. Los potenciales elevados y por consiguiente las corrientes altas originan intensidades de radiación mayores.

- **Lámpara de descarga sin electrodos:** Emite una altísima intensidad radiante y presentan el menor ancho de línea espectral en comparación con otras posibles fuentes de radiación. Su principal ventaja es que aumenta la intensidad de la radiación varios cientos de veces en comparación con las lámparas de cátodo hueco. Consisten en tubos de cuarzo sellados de varios centímetros de largo y de 5-10 mm de diámetro, lleno con unos miligramos del elemento analito, bajo una baja presión de argón.

Ese tubo se monta dentro de un generador de alta frecuencia (2400 MHz) y se excita con unos 200 vatios. Este tipo de lámpara es la adecuada para un rango de UV vacío, debido a las enormes pérdidas que se presentan por la absorción del aire, de la llama y de las lentes.

Sus principales desventajas son que sus vidas medias son relativamente cortas y además requieren calentarse un largo periodo. Se usan rutinariamente para elementos como el arsénico, el cesio y el rubidio.

- **Lámpara de vapor:** Son las más adecuadas para metales volátiles como Hg, Tl, Zn y metales alcalinos. Se ofrecen comercialmente a bajo precio, pero presentan la desventaja que emiten líneas muy anchas.

### **2.6.3.2.- ATOMIZADORES**

Para conseguir átomos en estado fundamental es necesario suministrar a la muestra una dosis de energía para disociar las moléculas, romper sus enlaces y llevar los átomos al estado fundamental procurando no rebasar el estado energético.

Las técnicas desarrolladas para la atomización de las muestras y obtención de átomos en estado fundamental son la llama, horno de grafito, generación de hidruros y vapor frío.

#### **A. Técnica de Llama**

En la atomización con llama, una disolución de la muestra se pulveriza en una llama mediante un nebulizador, el cual transforma la disolución de la muestra en un aerosol constituido por diminutas gotitas de líquido. A continuación ocurren una serie de procesos encadenados que dan como resultado una mezcla de átomos de analito, moléculas de la muestra, moléculas de óxido del analito y una variedad de especies moleculares y atómicas que se forman por reacciones entre el combustible, el oxidante y la muestra. Debido a la gran variedad de procesos complejos que tienen lugar, la atomización es la etapa más crítica de la espectroscopia de absorción atómica en llama (AAS).

#### **1) Tipos de llamas:**

En la tabla 2-13, se enumeran los combustibles y oxidantes más comunes que se utilizan en AAS y también las temperaturas que se alcanzan con cada una de las mezclas.

Cuando se utiliza el aire como oxidante se obtienen temperaturas de 1700 a 2400°C con varios combustibles. A esas temperaturas sólo las especies fácilmente excitables como los metales alcalinos y alcalinotérreos producen espectros de emisión aprovechables. Para los metales pesados, se debe emplear oxígeno u óxido nítrico como oxidante alcanzando temperaturas con los combustibles comunes de 2500 a 3100°C.

Las velocidades de combustión son de considerable importancia, porque las llamas sólo son estables a ciertos intervalos de caudal de la mezcla combustible/oxidante (el punto donde la velocidad de combustión y el caudal son iguales, es la región donde la llama es más estable).

**Tabla 2-13:** *Propiedades de la llama*

Combustible	Oxidante	Temperatura (°C)	Velocidad de combustión (cm*s <sup>-1</sup> )
Gas natural	Aire	1700-1900	39-43
Gas natural	Oxígeno	2700-2800	370-390
Hidrógeno	Aire	2000-2100	300-440
Hidrógeno	Oxígeno	2550-2700	900-1400
Acetileno	Aire	2100-2400	158-266
Acetileno	Oxígeno	3050-3150	100-2480
Acetileno	Óxido nitroso	2600-2800	285

## 2) Estructura de la llama:

Las regiones más importantes de la llama son la **zona de combustión primaria**, la **región interconal** y el **cono exterior**

- **La zona de combustión primaria** se reconoce por su luminiscencia azul que proviene de los espectros de bandas de C<sub>2</sub>, CH y otros radicales libres. En general en esta zona no se alcanza el equilibrio térmico, por lo que raras veces se utiliza para la espectroscopia de llama.
- **El área interconal** puede alcanzar varios cm de altura con fuentes ricas en combustible de acetileno/oxígeno o acetileno/óxido nitroso. La zona es con frecuencia la más rica en átomos libres por lo que es la parte de la llama que más se utiliza en espectroscopia.
- **El cono exterior** es la zona de reacción secundaria donde los productos formados en la región anterior se convierten en óxidos moleculares estables.

## B. Horno de Grafito:

La atomización tiene lugar en un tubo cilíndrico de grafito abierto por ambos extremos, y que tiene un orificio central para la introducción de la muestra mediante una micropipeta. El tubo es de unos 5 cm de largo y tiene un diámetro interno de algo menos de 1 cm. El

tubo intercambiable de grafito se ajusta perfectamente a un par de contactos eléctricos de grafito cilíndrico que se ubican en los dos extremos del tubo. Estos contactos se mantienen dentro de una caja metálica enfriada por agua. Existen dos conductos con gas inerte, un conducto externo que previene la entrada de aire exterior y la consiguiente incineración de tubo y un conducto interno por el que fluye gas desde los dos extremos del tubo hacia el orificio central del compartimento de muestra. Esta corriente interna no sólo elimina el aire sino que sirve para desalojar los vapores que se generan de la matriz de la muestra durante las dos primeras etapas de calentamiento.

Tienen una eficiencia de atomización mayor que la llama, y en consecuencia, los límites de detección absoluta son mejorados 100 o mil veces en comparación con los métodos de llama.

Los hornos de grafito generalmente proporcionan límites de detección absolutamente buenos (del orden de  $10^{-12}$ g) y son capaces de vaporizar muestras muy pequeñas. Han sido una solución satisfactoria para un conjunto de problemas analíticos para los cuales los límites de detección eran inadecuados con los atomizadores de llama, pero no son la panacea.

Sus principales inconvenientes son la menor precisión y la presencia de mayores interferencias que en los atomizadores de llama. La falta de precisión es consecuencia de la utilización de micromuestras.

Los hornos más utilizados son el **Manning, L'Vov y Massman.**

- **Horno de L'Vov:**

Se utiliza con frecuencia en los hornos de grafito; la plataforma es también de grafito y se encuentra debajo del orificio de entrada de la muestra.

La muestra se evapora y calcina sobre esta plataforma de manera usual. Sin embargo, cuando la temperatura se eleva con rapidez, la atomización no se completa porque la muestra no está el suficiente tiempo en contacto directo con la pared del horno. En consecuencia, la atomización tiene lugar en un medio en el cual no se produce un cambio tan rápido de temperaturas, y de este modo se obtienen picos reproducibles.

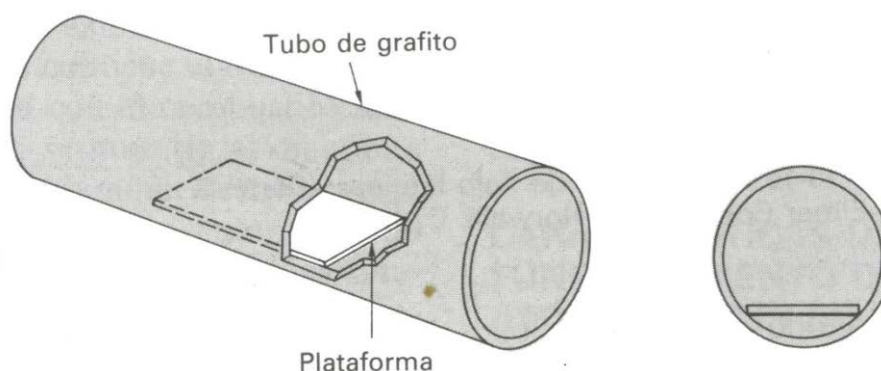
En la atomización con horno de grafito, se ha demostrado empíricamente que reduciendo la porosidad natural del tubo de grafito, se pueden mitigar algunos efectos de la matriz de la muestra y la mala reproducibilidad. Durante la atomización, parte del analito y de la

matriz al parecer difunden en el tubo, lo que retarda el proceso de atomización, de modo que se obtienen menores señales del analito. Para evitar este efecto, la mayoría de las superficies de grafito se recubren de una delgada capa de carbono pirolítico, que permite sellar los poros del tubo de grafito.

Estos atomizadores presentan la ventaja de su elevada sensibilidad para pequeños volúmenes de muestra. Se utilizan por lo general volúmenes entre 0.5 y 10  $\mu\text{L}$ .

En estas condiciones los límites de detección absolutos se encuentran en el intervalo de  $10^{-10}$  a  $10^{-13}$  g de analito. Los métodos de horno son lentos, requieren por lo común varios minutos por elemento. Otra desventaja es que el intervalo analítico es pequeño, siendo por lo general menor de dos órdenes de magnitud.

*Ilustración 2-2: Plataforma L'vov y su posición en el horno de grafito*



- **Horno de Massman:**

Es el que se utiliza más a menudo, consta de un cilindro hueco de grafito situado en la trayectoria del haz luminoso procedente de la lámpara de cátodo hueco, que está en contacto con unos electrodos, también de grafito, situados en sus extremos, entre los que se aplica una corriente eléctrica de 500 amperios y de 1000 voltios.

El cilindro de grafito está encerrado en una caja metálica con una ventana superior por la que se introduce la muestra (1-100  $\mu\text{l}$ ) la cual va a parar directamente al centro del interior del tubo de grafito.

Por efecto de la corriente eléctrica aplicada, la muestra principalmente se deseca a unos 100  $^{\circ}\text{C}$ , luego se incinera, se atomiza y finalmente se volatiliza. Todo ello se logra programando temperaturas crecientes a intervalos de tiempo previamente determinados.



Terminado el ciclo del programador, que dura unos pocos minutos, el circuito se desconecta automáticamente.

Durante todo el proceso circula por el interior de la caja metálica un flujo continuo de gas inerte (argón o nitrógeno), para prevenir la oxidación del grafito a altas temperaturas y también para evitar la formación de óxidos refractarios, y por una camisa a la caja metálica circula agua, refrigerando todo el sistema, para evitar el excesivo calentamiento del horno.

### **C. Técnica de generación de Hidruros**

Las técnicas de generación de hidruros proporcionan un método para la introducción de arsénico, estaño, selenio, bismuto y plomo como gases en un atomizador. Estos procedimientos aumentan la sensibilidad por un factor de 10 a 100. La determinación de estos elementos a bajos niveles de concentración es de gran importancia debido a que son altamente tóxicos.

La generación rápida de hidruros volátiles se produce, en general, por adición de una disolución acuosa de la muestra en medio ácido, a un pequeño volumen de una disolución acuosa de borohidruro de sodio al 1% contenido en una cubeta de vidrio.

Después de mezclarse durante un breve periodo de tiempo, el hidruro que se forma es arrastrado a la cámara de atomización mediante gas inerte. La cámara es por lo general un tubo de sílice calentado a unos cientos de grados en un horno o en una llama. La radiación de la fuente pasa a través del tubo hacia el monocromador y el detector. La señal es un pico similar al que se obtiene con la atomización electrotérmica.

### **D. Técnica de vapor frío**

Utilizada con exclusividad para la determinación de mercurio, por la elevada volatilidad que presenta este elemento.

En esquema, la técnica de vapor frío es muy semejante a la técnica de atomización por generación de hidruros.

En esencia, el mercurio presente en la muestra es químicamente reducido a su forma elemental mediante borohidruro sódico, y es arrastrado por una corriente de aire a través de una célula de absorción de cuarzo de unos 15 cm de longitud colocada en el haz de muestra del espectrofotómetro de absorción atómica.

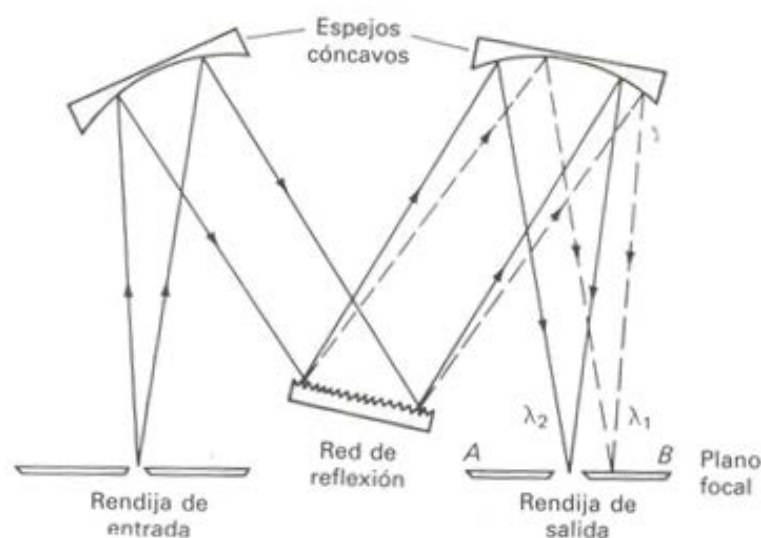
La célula se calienta a 100 °C eléctricamente para evitar la condensación del agua e incrementar la sensibilidad analítica.

La ventaja de la técnica de vapor frío es que permite determinar cantidades de mercurio menores de un microgramo.

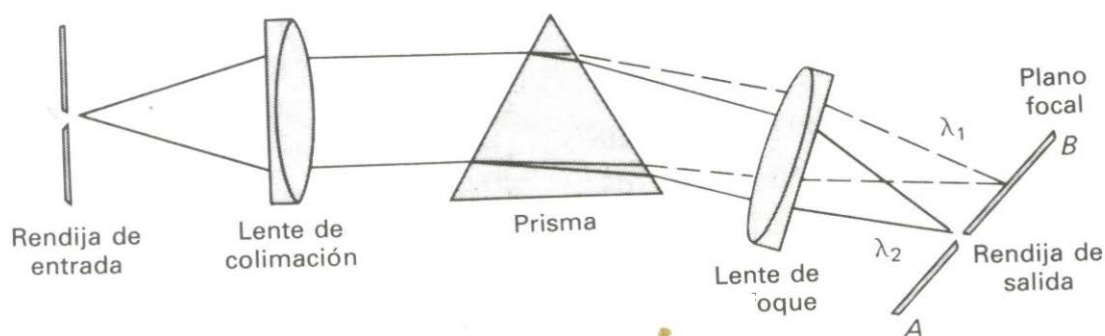
### 2.6.3.3.- MONOCROMADOR

Los monocromadores se diseñan para realizar barridos espectrales.

*Ilustración 2-3: Monocromador de red de Czerny-Turner*



*Ilustración 2-4: Monocromador de prisma de Bunsen.*



El monocromador está formado por los siguientes componentes:

- **Rendija de entrada:** proporciona una imagen óptica regular
- **Lente o espejo colimador:** produce un haz paralelo de radiación
- **Prisma o red reflexión:** dispersa la radiación a sus longitudes de onda individuales

- **Elemento focalizador:** forma de nuevo la imagen de la rendija y la enfoca a una superficie plana denominada plano focal
- **Rendija de salida en el plano focal:** aísla la banda espectral deseada.

Como se muestra en la figuras la radiación que entra en los monocromadores a través a través de la rendija de entrada, se colima y, entonces incide en la superficie del elemento dispersante (red de reflexión o prisma) con un ángulo dado. La radiación dispersada se enfoca en el plano focas AB en el que aparece en forma de dos imágenes rectangulares de la rendija de entrada (una para  $\lambda_1$  y la otra para  $\lambda_2$ ). Por rotación del elemento dispersante, se puede enfocar una u otra banda de la rendija de salida.

La calidad de un monocromador depende de la pureza de la radiación de salida, de su capacidad para resolver longitudes de onda adyacentes, de su poder de captación de luz y de su anchura espectral.

Las rendijas de un monocromador juegan un importante papel a la hora de determinar sus características de funcionamiento y calidad.

#### 2.6.3.4.- DETECTORES DE FOTONES

Los detectores de fotones también denominados fotoeléctricos o cuánticos tienen una superficie activa capaz de absorber radiación. Son muy usados para medir las radiaciones ultravioleta, visible o infrarroja cercana.

Existen diferentes tipos de detectores de fotones:

- A. Células fotovoltaicas,** en las que la energía radiante genera una corriente en la interfase entre una capa semiconductor y un metal
- B. Fototubos,** en los que la radiación causa la emisión de electrones a partir de una superficie sólida fotosensible
- C. Tubos fotomultiplicadores,** que contienen una superficie fotoemisora así como varias superficies adicionales, las cuales emiten una cascada de electrones cuando son alcanzadas por los electrones procedentes del área fotosensible.
- D. Detectores de fotoconductividad,** en los que la absorción de la radiación por un semiconductor produce electrones y agujeros, dando lugar así, a un aumento de la conductividad.

**E. Fotodiodos de silicio**, en los que los fotones aumentan la conductancia a través de una unión pn de polarización inversa

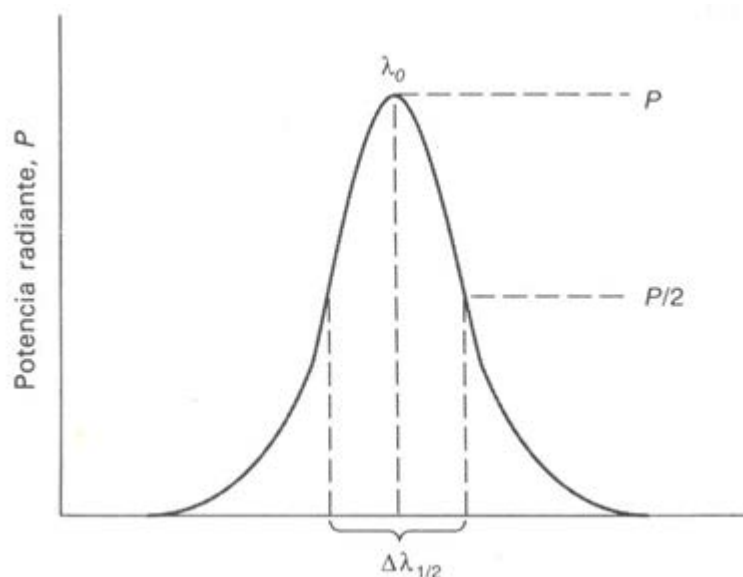
#### 2.6.4.- ESPECTROS DE ABSORCIÓN ATÓMICA.

Un espectro de absorción atómico característico consta predominantemente de líneas de resonancia, que son el resultado de transiciones del estado fundamental a niveles superiores.

En espectroscopia atómica la anchura de las líneas espectrales es de considerable importancia. Las líneas estrechas son muy convenientes tanto para el trabajo en absorción como emisión, dado que así reduce la posibilidad de interferencias por solapamientos espectrales.

Las líneas de absorción atómica presentan generalmente una distribución de longitudes de onda simétrica alrededor de una longitud de onda media  $\lambda_0$ , que coincide con la longitud de onda del máximo de absorbancia de la radiación absorbida.

*Ilustración 2-5: Perfil de una línea atómica.*



La anchura de línea resultante de una transición entre dos estados discretos de energía es cero, sin embargo distintos fenómenos provocan ensanchamiento de línea y las líneas atómicas tienen unas anchuras finitas.

El ensanchamiento se debe a cuatro causas:

**A. El efecto de incertidumbre:** Las líneas espectrales siempre tienen una anchura finita porque los tiempos de vida de uno o de ambos estados de transición son también

finitos, lo que conlleva incertidumbres en los tiempos de transición y en un ensanchamiento de la línea como consecuencia del principio de incertidumbre.

**B. El efecto Doppler:** La longitud de onda de la radiación emitida o absorbida por un átomo, que se mueve rápidamente, disminuye si el movimiento es hacia un detector y aumenta si el átomo se aleja del mismo. Este efecto se conoce como desplazamiento Doppler. La magnitud del desplazamiento Doppler aumenta con la velocidad a la que las especies que absorben o emiten se aproximan o se alejan del detector

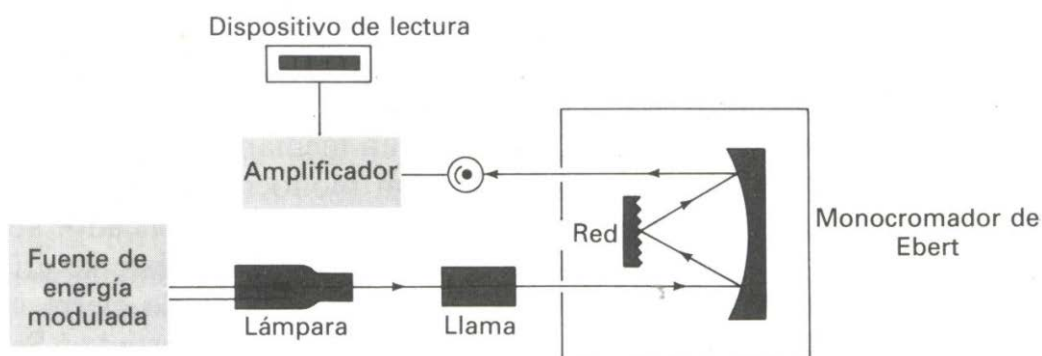
**C. Efectos de presión:** Se produce por colisiones de las especies, que emiten o que absorben, con otros átomos o iones presentes en el medio calorífico. Estas colisiones provocan pequeños cambios en los niveles de energía del estado fundamental y, por lo tanto, se origina una dispersión de las longitudes de onda emitidas y absorbidas. En las lámparas de cátodo hueco y de descarga de electrodos, el ensanchamiento se produce fundamentalmente como consecuencia de las colisiones entre los átomos que emiten y los otros del mismo tipo.

### 2.6.5.- INSTRUMENTOS PARA LA ESPECTROSCOPIA DE ABSORCIÓN ATÓMICA.

#### A. Espectrofotómetros de un solo haz:

Consiste en varias fuentes de cátodo hueco, un cortador o una fuente de alimentación de impulsos, un atomizador y un espectrofotómetro sencillo de red de difracción con un fotomultiplicador como transductor.

*Ilustración 2-6: Esquema de espectrofotómetro de un solo haz.*



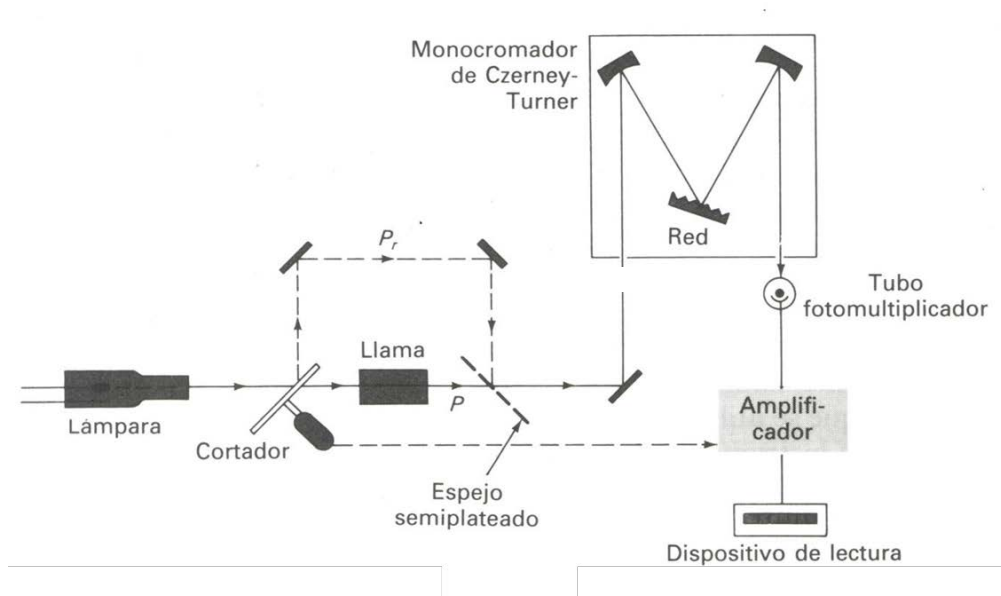
#### B. Espectrofotómetros de doble haz

El haz que proviene de la fuente de cátodo hueco se divide mediante un cortador reflectante, de esta forma la mitad pasa a través del atomizador, y la otra mitad fuera de

él. Los dos haces se recombinan mediante un espejo semiplataado y llegan a un monocromador de red y un tubo fotomultiplicador actúa como transductor.

Es de señalar que el haz de referencia no pasa a través del atomizador, y por consiguiente no existe una corrección por la pérdida de potencia radiante debida a la absorción o dispersión de la radiación por la propia llama.

*Ilustración 2-7: Esquema de espectrofotómetro de doble haz.*



## 2.6.6.- INTERFERENCIAS

En los métodos de absorción atómica de atomización con llama o electrotermia se encuentran dos tipos de interferencias, *interferencias espectrales* e *interferencias químicas*:

**A. Interferencias espectrales** se producen cuando la absorción o emisión de una especie que interfiere se solapa o aparece muy próxima a la absorción o emisión del analito, de modo que su resolución por el monocromador resulta imposible. Pueden ser debidas a:

- 1) **Superposición de líneas:** para que ocurra esta interferencia la separación de las líneas debe ser menor a 0,1
- 2) **Productos de combustión** que poseen bandas de absorción anchas, o de aerosoles que dispersan la radiación. Ambos, disminuyen la intensidad de haz transmitido, y dan lugar a errores analíticos positivos. Cuando la única fuente de estos productos es la mezcla de combustible y oxidante, se puede fácilmente realizar la corrección midiendo la absorbancia del blanco

- 3) **Productos de atomización;** se produce con frecuencia cuando se aspira en la llama disoluciones concentradas que contienen elementos tales como Ti, Zr y W, los cuales forman óxidos refractarios. En estos casos se forman partículas de óxidos metálicos cuyos diámetros son mayores que la longitud de la luz, lo que origina una dispersión del haz incidente.
- 4) **Matriz de la muestra;** en este caso se produce una absorción o dispersión de la radiación. La potencia de haz transmitido se reduce por la presencia de los componentes de la matriz, mientras que la potencia del haz incidente, no resulta afectada, por ello se produce un error positivo en la absorbancia y por consiguiente en la concentración. En la atomización en llama las interferencias que provienen de los componentes de matriz no siempre se presentan, y con frecuencia se pueden evitar modificando parámetros analíticos como la temperatura y la relación combustible/oxidante. De una manera alternativa si se conoce la causa de la interferencia, se puede añadir un exceso de la sustancia interferente tanto a la muestra como a los patrones; siempre que el exceso sea grande respecto con respecto a su concentración en la matriz de la muestra, la contribución de esta última será insignificante. La sustancia añadida se denomina a veces *amortiguador de radiación*.

Los problemas de las interferencias de matriz en atomización electrotérmica se consiguen reducir al nivel que se presenta en llama con distintos métodos de corrección como:

- **Método de corrección de las dos líneas:** Este procedimiento requiere la existencia de una línea de referencia que provenga de la fuente, la cual ha de estar lo más próxima posible a la línea del analito, pero no deber ser absorbida por éste. Si se reúnen estas condiciones, se supone que cualquier disminución de la potencia de la línea de referencia con respecto a lo observado en la calibración, se debe a la absorción o dispersión por los componentes de la matriz de la muestra; esta disminución se utiliza entonces para corregir la absorbancia de la línea de analito.
- **Método de corrección con una fuente continua:** Se utiliza una lámpara de deuterio como fuente de radiación continua en toda la región ultravioleta. La configuración del cortador se modifica para que la radiación de la fuente

continua y la de la lámpara de cátodo hueco pasen alternadamente a través del atomizador de tubo de grafito. La anchura de rendija se ajusta con un ancho suficiente para que la fracción de la fuente continua que absorbe por los átomos de la muestra sea despreciable. En consecuencia, la atenuación de su potencia durante el paso a través de la muestra atomizada, indica solamente la absorción de banda ancha o la dispersión producida por los componentes de la matriz de la muestra. De esta manera se consigue la corrección de fondo.

- **Método de corrección de fondo basada en el efecto Zeeman:** Cuando el vapor atómico se expone a un intenso campo magnético, se produce un desdoblamiento de los niveles energéticos de los átomos, lo que conduce a la formación de diferentes líneas de absorción para cada transición electrónica. Estas líneas difieren una de otra en unos 0,01nm, siendo la suma de las absorbancias de estas líneas exactamente igual a la línea de la cual proceden. Este fenómeno, común para todos los espectros atómicos, se denomina el efecto Zeeman. En función del tipo de transición electrónica implicado en el proceso de absorción, existen diversos modelos de desdoblamiento; el modelo más simple que se observa con transiciones singulete, conduce a una línea central  $\pi$ , y a dos líneas satélite  $\sigma$  igualmente espaciada. La línea central, que coincide con la longitud de onda original, tiene una absorbancia doble que la de cada línea  $\sigma$ . En transiciones más complejas, se producen desdoblamientos adicionales de las líneas  $\pi$  y  $\sigma$ .

La aplicación del efecto Zeeman en los instrumentos de absorción atómica se basa en la distinta respuesta de la radiación polarizada de los dos tipos de picos de absorción. El pico  $\pi$  absorbe solamente la radiación que está polarizada en un plano paralelo al campo magnético externo; por contraste, los picos  $\sigma$  sólo absorben radiación polarizada a 90 grados del campo. Existe un segundo tipo de instrumento Zeeman, en el que un imán rodea la fuente ce cátodo hueco. En este caso se desdoblan los espectros de emisión de la fuente en lugar de los espectros de absorción de la muestra.

- **Corrección de fondo basada en la fuente de autoinversión:** Se basa en la autoinversión, o auto absorción, comportamiento de la radiación que emiten las lámparas de cátodo hueco cuando se le aplican corrientes elevadas. Las



elevadas corrientes producen una gran concentración de átomos no excitados, los cuales son capaces de absorber la radiación emitida por las especies excitadas. Un efecto adicional de las corrientes elevadas es el gran ensanchamiento que originan en las bandas de las especies excitadas. El efecto neto produce una banda con un mínimo en su centro, que corresponde exactamente a la longitud de onda del pico de absorción. A fin de obtener absorbancias corregidas, se programa la lámpara para funcionar alternadamente con altas y bajas corrientes. La absorbancia total se obtiene cuando se opera a bajas corrientes, y la absorbancia de fondo resulta de las medidas en la segunda parte del ciclo, cuando la radiación en el pico de absorbancia está en el mínimo. El sistema de adquisición de datos resta la absorbancia de fondo de la total para obtener un valor corregido.

**B. Interferencias químicas:** Son más comunes que las espectrales, se producen como consecuencia de diversos procesos químicos que ocurren durante la atomización y que alteran las características de absorción del analito. Pueden ser debidas a:

- Formación de compuestos poco volátiles
- Equilibrios de disociación
- Ionización en la llama

### **2.6.7.- MODIFICADORES QUÍMICOS**

Los modificadores de matriz son sustancias químicas, modificadores químicos, que se adicionan a las muestras, patrones, o a la superficie del tubo de grafito, para eliminar la matriz a menor temperatura o retener el analito a las temperaturas que se elimina la matriz. Los modificadores de matriz a veces contaminan la muestra con el resultado de un blanco elevado, aunque para la mayor parte de los metales la utilización de un modificador de matriz es imprescindible. Como modificadores se pueden utilizar el Ni, Pd, Mg, Ir y los fosfatos entre otros, así como mezclas de los mismos. El Pd sólo o en combinación con otros modificadores es el modificador más ampliamente utilizado llegando a ser propuesto como modificador universal.

### **2.6.8.- APLICACIONES**

Existen condicionantes instrumentales que hacen que en el momento actual se puedan determinar 82 elementos. Desde el punto de vista técnico es perfectamente factible la

fabricación de cualquier lámpara de cualquiera de los elementos del sistema periódico. Desgraciadamente, no puede decirse lo mismo de los detectores, los cuales sólo presentan una sensibilidad aceptable en un determinado intervalo de longitudes de onda.

Por otra parte, el sistema de obtención de átomos en estado fundamental, es decir la llama, presenta una fuerte absorción a longitudes de onda inferiores a 200 nm, lo cual impide trabajar por debajo de esas frecuencias, salvo con otras técnicas como el horno de grafito. Además, a estas bajas frecuencias el oxígeno del aire absorbe radiaciones UV, por lo que para trabajar en este rango es preciso purgar todo el sistema con gases inertes.

Los equipos de absorción atómica actuales trabajan en el rango de frecuencias de 190 a 850 nm.

## **2.7.- TEORIA DE VALORES DE REFERENCIA**

### **2.7.1.- FUENTES DE VARIACIÓN**

Según el protocolo C28-A2 propuesto por el Instituto norteamericano de estándares clínicos y de laboratorio (Clinical and Laboratory Standard Institute CLSI) el primer paso para establecer los valores de referencia de una población se basa en la obtención bibliográfica de las posibles fuentes de variación biológica e interferencias en la concentración del Manganese, para ello realizamos búsquedas bibliográficas en las bases MEDLINE y EMBASE.

De las publicaciones consultadas extraemos que son posibles fuentes de variación:

#### **2.7.1.1.- La edad [260] , [261]**

#### **2.7.1.2.- La ingesta [262]**

No son significativos los efectos de:

#### **2.7.1.3.- Las variaciones circadianas y anuales [263]**

#### **2.7.1.4.- Cambio de estaciones [264], [265]**

#### **2.7.1.5.- El sexo [266], [267]**

### **2.7.2.- SELECCIÓN DE LOS INDIVIDUOS DE REFERENCIA**

La salud de los neonatos escogidos se evalúa con el índice Apgar, es un examen clínico donde el neonatólogo realiza una prueba medida en 3 estándares sobre el recién nacido

para obtener una primera valoración simple (macroscópica), y clínica sobre el estado general del neonato después del parto.

**Tabla 2-14:** Los cinco criterios del Apgar.

	0 puntos	1 punto	2 puntos	Acrónimo
<b>Color de la piel</b>	todo azul	extremidades azules	normal	Apariencia
<b>Frecuencia cardíaca</b>	no posee	<100	>100	Pulso
<b>Reflejos e irritabilidad</b>	sin respuesta a estimulación	mueca / llanto débil al ser estimulado	estornudos / tos / pataleo al ser estimulado	Gesto
<b>Tono muscular</b>	ninguna	alguna flexión	movimiento activo	Actividad
<b>Respiración</b>	ausente	débil o irregular	fuerte	Respiración

Si el bebé está en buenas condiciones obtendrá una puntuación de 8 a 10 puntos. Si obtiene de 4 a 6 puntos su condición fisiológica no está respondiendo adecuadamente y el neonato requiere una valoración clínica y recuperación inmediata. Si es menor que 4, necesita atención de emergencia como medicamentos intravenosos, y respiración asistida.

A los cinco minutos se realiza la misma evaluación, valorando la adaptación del bebé al medio, por lo que el resultado deberá ser mayor que el primero y superior a 7 puntos.

### 2.7.3.- CRITERIOS DE INCLUSIÓN Y EXCLUSIÓN

Considerando las posibles fuentes de variación el objeto de nuestro interés se centró en la población de recién nacidos dada la hipótesis del riesgo de intoxicación en aquellos recién nacidos que precisen nutrición parenteral.

La selección de individuos candidatos a formar parte de los individuos de referencia se hizo:

- Recién nacidos vivos, en su primer día de vida.
- Ambos sexos.
- Nacimientos consecutivos sin exclusión por fechas hasta conseguir el tamaño muestral estimado en las guías clínicas de 120.
- Apgar superior a 6 a los 5 minutos.

- No se realizó exclusión por raza dado que no existen indicaciones bibliográficas que apoyen ese criterio.

Se obtuvieron muestras de sangre de cordón para evitar la contaminación, se usaron los excedentes de las muestras obtenidas para la medición rutinaria del hematocrito rodado en todos los recién nacidos del Hospital Universitario Severo Ochoa, recogiendo del Servicio de Hematología antes de 24 horas en las que las muestras que han procesado son desechadas. Dado que fueron excedentes de muestras anónimas conforme a la ley de Protección de Datos, no se elaboró consentimiento informado materno.

#### 2.7.4.- FACTORES PREANALÍTICOS

- Recolección de las muestras.
- Conservación.

Cuando lo autoriza el neonatólogo, se liga y secciona el cordón umbilical de acuerdo a los procedimientos habituales.

*Ilustración 2-8: Sección del cordón umbilical*



Una vez que se ha seccionado el cordón umbilical y separado al recién nacido, se limpia el cordón con alcohol para evitar contaminar la recolección con sangre materna.

Se desinfecta el sitio donde se realizará la punción en la vena umbilical. Ese sitio estará cercano al extremo seccionado del cordón. No se debe volver a tocar la zona desinfectada. Se coloca el tubo de recolección por debajo del plano del abdomen de la parturienta.

Se deja que por gravedad fluya la sangre dentro del tubo, ayudada por las contracciones uterinas. Se ayuda a que se produzca la mezcla de la sangre con el anticoagulante mediante una suave y continúa rotación del tubo.

***Ilustración 2-9: Punción de la vena umbilical.***



Las muestras obtenidas se recogen en tubos con anticoagulante EDTA potásico y se mantuvieron congelados a -80°C hasta su procesado.

#### **2.7.5.- CONTAMINACIÓN**

Para controlar la posible contaminación procedente del tubo se midió la concentración de Mn en agua acidificada mantenida 48 horas en los tubos.

Los resultados obtenidos fueron inferiores al límite de detección por lo que descartamos que los tubos de extracción sean una fuente de contaminación de Mn.

#### **2.7.6.- CRITERIOS DE PARTICIÓN DE LA POBLACIÓN**

Las variables recogidas como posibles criterios de partición han sido:

- Sexo
- Peso al nacer
- Apgar
- Edad de la madre
- Semanas de gestación
- Tipo de parto
- Concentración de bilirrubina total

### 3.- PARTE EXPERIMENTAL

#### 3.1.- POBLACIÓN, MATERIAL Y MÉTODOS

##### 3.1.1.- POBLACIÓN

Las muestras de sangre de neonatos se obtendrán de los excedentes de sangre de cordón del Servicio de Hematología.

Las muestras de los niños con NPT y lactantes se obtendrán también de excedentes tras realizar los análisis solicitados por el Servicio de Pediatría.

- **Criterios de inclusión:** menor de 6 meses, nacido en el hospital.
- **Criterios de exclusión:** enfermedad aguda conocida.

Las muestras de leche artificial (una de cada tipo aportadas a los niños en los meses del muestreo) y las muestras de NPT solicitarán al Servicio de Farmacia.

Las muestras de leche materna se obtendrán de los excedentes de leche de las madres que tienen a sus hijos en neonatos, previa entrega de un consentimiento informado (ver anexos 1 y 2).

##### 3.1.2.- MÉTODO

El Laboratorio de Bioquímica del HUSO cuenta con un **Espectrofotómetro de Absorción Atómica modelo SpectrAA-300 de Varian con corrección de fondo Zeeman y horno de grafito** de fabricación Australiana importado por Varian Ibérica S.L., en el que se realizarán las determinaciones de Mn.

*Ilustración 3-1: Espectrofotómetro de Absorción atómica modelo SpectrAA-300*



**Lámpara de cátodo hueco para Mn** (código: 5610125200) fabricada por Varian Australia; las condiciones operación óptimas suministradas por la casa comercial son las siguientes:

- **Gas:** Argón
- **Ventana:** Cuarzo
- **Intensidad máxima:** 15mA
- **Intensidad Recomendada:** 5mA
- **Longitud de onda ( $\lambda$ ):** 279,5nm
- **Anchura de rendija:** 0,2nm
- **Horno de grafito:** modelo GTA-96 de VARIAN
- **Tubos de grafito sin plataforma:** Partition tubes (coated)-GTA de VARIAN
- **Tubos de grafito con plataforma:** Centerfixed platformtubes de VARIAN
- **Muestreador automático programable** PSD-100 con capacidad para 50 muestras por carrusel en viales de 2 mL, estándar , modificador y blanco

**Ilustración 3-2:** Muestreador automático programable PSD-100.



### 3.1.3.- REACTIVOS Y ESTÁNDARES

- **Solución estándar de manganeso** de SIGMA, Lote 109F3405, que contiene 1010 $\mu$ g Mn/mL
- **Ácido nítrico (HNO<sub>3</sub>) al 65% PRS** de PANREAC
- **Modificador de matriz: nitrato de paladio** de Merck, referencia 1.07289.0050 que contiene 10,0  $\pm$  0,2g/L
- **Controles de Seronorm TM Trace Elements SERUM** niveles 1 y 2
- El **agua** empleada, apta para absorción atómica, fue tratada en un sistema **Milli-Q** (Millipore, Bedford,)
- **Mezcla de sangre total**
- **Tritón X100** (Número de agregación 100 – 155, Peso mol medio 625 g/mol)
- **Agua regia HCl: HNO<sub>3</sub> (3:1):** para limpieza de todo el material utilizado (el secado se realizó a temperatura ambiente)
- **Solución de lavado:** 250  $\mu$ L Tritón X100, 500  $\mu$ L de agua Milli Q, y 250  $\mu$ L de HNO<sub>3</sub>

El Tritón actúa como detergente eliminando los residuos carbonosos formados en el interior del tubo de grafito y ayuda en la limpieza del muestreador entre muestras.



También evita la adsorción del analito en la superficie de los recipientes, obstrucción de la pipeta de muestreo y mejora la dispersión de la muestra en las paredes del tubo de grafito [257]

### 3.2.- OBTENCIÓN DE UN PICO DE ABSORBANCIA DEL Mn

Se parte de las condiciones iniciales de programa que recomienda VARIAN para la determinación de Mn en este equipo:

- **Elemento:** Manganese
- **Matriz:** Muestra biológica
- **Modo Instrumento:** Absorbancia
- **Modo calibración:** Concentración
- **Modo medida:** Altura del pico
- **posición lámpara:**3
- **Intensidad de la lámpara:** 5 mA
- **Ancho de rendija:** 0,2 nm
- **Altura de rendija:** Reducida
- **Longitud de onda del pico de absorbancia:** 279,5nm
- **Introducción de muestra:** Automática
- **Tiempo de medida:** 1 segundo
- **Replicas:** 3
- **Activada la corrección de fondo**
- **Máximo de absorbancia:** 2,00
- **Señal de la lámpara:** 0,740
- **Fotomultiplicador:** 460,8 voltios
- **Tubo de grafito:** SIN plataforma L'vov

**Tabla 3-1:** Programa de temperaturas, tiempo, flujo de gas y lectura

	Pasos	T (°C)	t (s)	Flujo gas (L/min)	Gas	Lectura
<b>SECADO</b>	1	85	5	3	Argón	NO
	2	95	40	3	Argón	NO
<b>CALCINACIÓN</b>	3	120	20	3	Argón	NO
	4	300	5	3	Argón	NO
	5	400	20	3	Argón	NO
	6	1100	5	3	Argón	NO
	7	1100	10	3	Argón	NO
	8	1100	2	0	-	NO
<b>ATOMIZACIÓN</b>	9	2500	0,7	0	-	SI
	10	2500	1	0	-	SI
<b>LAVADO</b>	11	2500	1	3	Argón	NO

El primer paso que se da antes de optimizar el método es ver si en las condiciones anteriormente citadas obtenemos un pico de absorbancia para el Mn.

Se programa el equipo para que en primer lugar haga un blanco sin limpieza de tubo pipeteando 10 µL de agua milli Q por triplicado y a continuación pipetee por triplicado 10 µL de una disolución de 20µg/L de Mn en HNO<sub>3</sub> al 1%.

De este modo se obtiene un blanco con una señal media de Absorbancia de 0,005 y una desviación estándar (SD) de 0,001. Y un pico con una señal media de absorbancia de 0,520 con una SD =1,1.

### 3.3.- OPTIMIZACIÓN DEL MÉTODO

#### 3.3.1.- INTENSIDAD DE LAMPARA, ALTURA Y ANCHO DE RENDIJA

- **Condiciones de trabajo:**
  - **Elemento:** Manganeseo
  - **Matriz:** Muestra biológica
  - **Modo Instrumento:** Absorbancia.

- **Modo calibración:** Concentración
- **Modo medida:** Altura del pico
- **posición lámpara:**3
- **Intensidad de la lámpara:** 5 mA
- **Ancho de rendija:** 0,2 nm
- **Altura de rendija:** Reducida
- **Longitud de onda del pico de absorbancia:** 279,5nm
- **Introducción de muestra:** Automática
- **Tiempo de medida:** 1 segundo
- **Replicas:** 3
- **Activada la corrección de fondo**
- **Máximo de absorbancia:** 2,00
- **Señal de la lámpara:** 0,740
- **Fotomultiplicador:** 460,8 voltios
- **Tubo de grafito:** SIN plataforma L'vov
- **Programa de temperaturas, tiempo, flujo de gas y lectura** (ver tabla 3-1)
- **Parámetros variables:**
  - Intensidad de la lámpara
  - Ancho de rendija
  - Altura de rendija

Se mide por triplicado la señal de absorbancia correspondiente a 10 µL de una solución estándar de 20 µg/L de Mn en HNO<sub>3</sub> al 1% para todas las combinaciones posibles de ancho de rendija, altura de rendija e intensidad de la lámpara.

**Tabla 3-2:** Señal de Absorbancia para las distintas combinaciones de intensidad de lámpara, altura y ancho de rendija.

Ancho	ALTURA DE RENDIJA REDUCIDA				ALTURA DE RENDIJA NORMAL			
	0,1 nm	0,2 nm	0,5 nm	1 nm	0,1 nm	0,2 nm	0,5 nm	1 nm
<b>Intensidad</b>								
<b>I= 0 mA</b>	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>I= 1 mA</b>	-	-	0,469	0,452	-	-	-	-
<b>I= 2 mA</b>	-	0,494	0,446	0,466	0,624	0,520	-	-
<b>I= 3 mA</b>	-	0,477	-	0,445	0,639	0,586	-	-
<b>I= 4 mA</b>	-	0,445	-	-	<b>0,644</b>	0,585	-	-
<b>I= 5 mA</b>	-	0,520	-	-	0,629	0,579	-	-
<b>I= 6 mA</b>	-	0,587	-	-	0,614	0,566	-	-
<b>I= 7 mA</b>	-	0,573	-	-	0,609	0,577	-	-
<b>I= 8 mA</b>	-	0,538	-	-	0,592	0,541	-	-
<b>I= 9 mA</b>	-	0,520	-	-	0,591	0,517	-	-
<b>I= 10 mA</b>	-	0,527	-	-	0,570	0,562	-	-
<b>I= 11 mA</b>	-	0,506	-	-	0,550	0,537	-	-
<b>I= 12 mA</b>	-	0,447	-	-	0,530	0,518	-	-
<b>I= 13 mA</b>	-	0,458	-	-	0,505	0,490	-	-
<b>I= 14 mA</b>	-	0,423	-	-	0,484	0,472	-	-
<b>I= 15 mA</b>	-	0,395	-	-	0,398	0,450	-	-
<b>I= 16 mA</b>	-	0,376	-	-	-	0,441	-	-
<b>I= 17 mA</b>	-	0,359	-	-	-	0,463	-	-
<b>I= 18 mA</b>	-	0,344	-	-	-	0,384	-	-
<b>I= 19 mA</b>	-	0,329	-	-	-	-	-	-
<b>I= 20 mA</b>	-	-	-	-	-	-	-	-

(El signo “-” indica que no se obtiene señal)

Como se puede observar en la tabla 3-2 la mayor señal de absorbancia se obtiene bajo las condiciones siguientes:

- Intensidad de la lámpara: **4 mA**
- Ancho de rendija: **normal**
- Altura de rendija **0,1nm**

### 3.3.2.- OPTIMIZACIÓN DEL PROGRAMA DE TEMPERATURAS

#### 3.3.2.1.- FASE DE SECADO

- **Parámetros que se mantienen constantes:**
  - **Elemento:** Manganeso
  - **Matriz:** Muestra biológica

- **Modo Instrumento:** Absorbancia
- **Modo calibración:** Concentración
- **Modo medida:** Altura del pico
- **posición lámpara:**3
- **Longitud de onda del pico de absorbancia:** 279,5nm
- **Introducción de muestra:** Automática
- **Tiempo de medida:** 1 segundo
- **Replicas:** 3
- **Activada la corrección de fondo**
- **Máximo de absorbancia:** 2,00
- **Señal de la lámpara:** 0,740
- **Fotomultiplicador:** 460,8 voltios
- **Tubo de grafito:** SIN plataforma L´vov
- **Intensidad de la lámpara:** 4 mA
- **Ancho de rendija:** Normal
- **Altura de rendija:** 0,1nm

**Tabla 3-3:** Programa de temperaturas, tiempo, flujo de gas y lectura. (Temperatura de secado variable)

	Pasos	T (°C)	t (s)	Flujo gas (L/min)	Gas	Lectura
<b>SECADO</b>	1		5	3	Argón	NO
	2		40	3	Argón	NO
<b>CALCINACIÓN</b>	3	120	20	3	Argón	NO
	4	300	5	3	Argón	NO
	5	400	20	3	Argón	NO
	6	1100	5	3	Argón	NO
	7	1100	10	3	Argón	NO
	8	1100	2	0	-	NO
<b>ATOMIZACIÓN</b>	9	2500	0,7	0	-	SI
	10	2500	1	0	-	SI
<b>LAVADO</b>	11	2500	1	3	Argón	NO

- **Parámetros variables:**

- Temperatura de secado paso 1
- Temperatura de secado paso 2

Se mide la señal media de absorbancia correspondiente a 20 µL de una solución formada por:

- 5µL de una solución de 20µg Mn/L en HNO<sub>3</sub> al 1%
- 10µL de una mezcla de sangre total
- 5µL de agua milliQ (blanco)

Variando las temperaturas de secado en un  $\pm 10\%$  de las temperaturas de secado de partida (paso1: 85°C, paso2: 95 °C) y manteniendo constantes las temperaturas de calcinación, atomización y lavado.

**Tabla 3-4:** Señales de absorbancia para distintas temperaturas de secado.

T SECADO ( °C)	ABSORBANCIA MEDIA	DESVIACIÓN ESTÁNDAR
Paso 1: 77	0,745	9,6
Paso 2: 86		
Paso 1: 85	0,675	13,9
Paso 2: 95		
Paso 1: 94	<b>0,753</b>	<b>2,1</b>
Paso 2: 105		
Paso 1:103	0,713	0,3
Paso 2: 116		
Paso 1: 111	0,597	10,4
Paso 2: 124		

Como se puede observar en la tabla 3-4 la mayor señal de absorbancia se obtiene bajo las condiciones siguientes:

- Temperatura de secado paso1: 94 °C
- Temperatura de secado paso2: 105 °C

### 3.3.2.2.- FASE DE CALCINACIÓN

- **Parámetros que se mantienen constantes:**

- **Elemento:** Manganeseo

- **Matriz:** Muestra biológica.
- **Modo Instrumento:** Absorbancia.
- **Modo calibración:** Concentración
- **Modo medida:** Altura del pico
- **posición lámpara:**3
- **Longitud de onda del pico de absorbancia:** 279,5nm
- **Introducción de muestra:** Automática
- **Tiempo de medida:** 1 segundo
- **Replicas:** 3
- **Activada la corrección de fondo**
- **Máximo de absorbancia:** 2,00
- **Señal de la lámpara:** 0,740
- **Fotomultiplicador:** 460,8 voltios
- **Tubo de grafito:** SIN plataforma L´vov
- **Intensidad de la lámpara:** 4 mA
- **Ancho de rendija:** Normal
- **Altura de rendija:** 0,1nm

**Tabla 3-5:** Programa de temperaturas, tiempo, flujo de gas y lectura. (Temperatura de calcinación variable)

	Pasos	T (°C)	t (s)	Flujo gas (L/min)	Gas	Lectura
SECADO	1	94	5	3	Argón	NO
	2	105	40	3	Argón	NO
CALCINACIÓN	3		20	3	Argón	NO
	4		5	3	Argón	NO
	5		20	3	Argón	NO
	6		5	3	Argón	NO
	7		10	3	Argón	NO
	8		2	0	-	NO
ATOMIZACIÓN	9	2500	0,7	0	-	SI
	10	2500	1	0	-	SI
LAVADO	11	2500	1	3	Argón	NO

• **Parámetros variables:**

- Temperaturas de calcinación de los pasos 3 al 8

Se mide la señal media de absorbancia correspondiente a 25 µL de una solución formada por:

- 10 µL de una solución de 20µg Mn/L en HNO<sub>3</sub> al 1%
- 10µL de una mezcla de sangre total
- 5µL de agua milliQ (blanco)

Variando las temperaturas de calcinación en un  $\pm 10\%$  de las temperaturas de calcinación de partida (paso 3: 120°C, paso 4: 300 °C , paso 5: 400°C, paso 6: 1100 °C, paso 7: 1100 °C , paso 8: 1100 °C) y manteniendo constantes las temperaturas de secado optimizada y las temperaturas de atomización y lavado.

**Tabla 3-6:** Señales de absorbancia para distintas temperaturas de calcinación.

T CALCINACIÓN ( °C)	ABS. MEDIA	DESV. ESTÁNDAR
<b>Paso 3: 108</b>	0,682	2,0
<b>Paso 4: 270</b>		
<b>Paso 5: 360</b>		
<b>Paso 6: 990</b>		
<b>Paso 7: 990</b>		
<b>Paso 8: 990</b>		
<b>Paso 3:120</b>	<b>0,810</b>	<b>2,6</b>
<b>Paso 4: 300</b>		
<b>Paso 5: 400</b>		
<b>Paso 6: 1100</b>		
<b>Paso 7: 1100</b>		
<b>Paso 8: 1100</b>		
<b>Paso 3: 132</b>	0,742	11,8
<b>Paso 4: 330</b>		
<b>Paso 5: 440</b>		
<b>Paso 6: 1210</b>		
<b>Paso 7: 1210</b>		
<b>Paso 8: 1210</b>		

Como se puede observar en la tabla 3-6 la mayor señal de absorbancia se obtiene bajo las condiciones siguientes:

- Temperatura de calcinación paso 3: 120 °C
- Temperatura de calcinación paso 4: 300 °C



- Temperatura de calcinación paso 5: 400 °C
- Temperatura de calcinación paso 6: 1100 °C
- Temperatura de calcinación paso 7: 1100 °C
- Temperatura de calcinación paso 8: 1100 °C

### 3.3.2.3.- FASE DE ATOMIZACIÓN.

- **Parámetros que se mantienen constantes:**

- **Elemento:** Manganese
- **Matriz:** Muestra biológica.
- **Modo Instrumento:** Absorbancia
- **Modo calibración:** Concentración
- **Modo medida:** Altura del pico
- **posición lámpara:**3
- **Longitud de onda del pico de absorbancia:** 279,5nm
- **Introducción de muestra:** Automática
- **Tiempo de medida:** 1 segundo
- **Replicas:** 3
- **Activada la corrección de fondo**
- **Máximo de absorbancia:** 2,00
- **Señal de la lámpara:** 0,740
- **Fotomultiplicador:** 460,8 voltios
- **Tubo de grafito:** SIN plataforma L'vov
- **Intensidad de la lámpara:** 4 mA
- **Ancho de rendija:** Normal
- **Altura de rendija:** 0,1nm

**Tabla 3-7:** Programa de temperaturas, tiempo, flujo de gas y lectura. (Temperatura de atomización variable)

	Pasos	T (°C)	t (s)	Flujo gas (L/min)	Gas	Lectura
<b>SECADO</b>	1	<b>94</b>	5	3	Argón	NO
	2	<b>105</b>	40	3	Argón	NO
<b>CALCINACIÓN</b>	3	<b>120</b>	20	3	Argón	NO
	4	<b>300</b>	5	3	Argón	NO
	5	<b>400</b>	20	3	Argón	NO
	6	<b>1100</b>	5	3	Argón	NO
	7	<b>1100</b>	10	3	Argón	NO
	8	<b>1100</b>	2	0	-	NO
<b>ATOMIZACIÓN</b>	9		0,7	0	-	SI
	10		1	0	-	SI
<b>LAVADO</b>	11	2500	1	3	Argón	NO

• **Parámetros variables:**

- Temperaturas de atomización de los pasos 9 y 10

Se mide la señal media de absorbancia correspondiente a 25 µL de una solución formada por:

- 10µL de una solución de 20µg Mn/L en HNO<sub>3</sub> al 1%
- 10µL de una mezcla de sangre total
- 5µL de agua milliQ (blanco)

Variando las temperaturas de atomización en un  $\pm 10\%$  de las temperaturas de atomización de partida (paso 9: 2500°C, paso 10: 2500 °C) , manteniendo constantes las temperaturas de secado y calcinación ya optimizadas y la temperatura de lavado.

**Tabla 3-8:** Señales de absorbancia para distintas temperaturas de atomización

T ATOMIZACIÓN ( °C)	ABS. MEDIA	DESV. ESTÁNDAR
Paso 9: 2250	0,711	6,2
Paso 10: 2250		
Paso 9: 2500	0,871	4,5
Paso 10: 2500		
Paso 9: 2750	0,806	0,3
Paso 10: 2750		

Como se puede observar en la tabla 3-8 la mayor señal de absorbancia se obtiene bajo las condiciones siguientes:

- Temperatura de atomización paso 9: 2500 °C
- Temperatura de atomización paso 10: 2500 °C

### 3.3.3.- OPTIMIZACIÓN DEL PROGRAMA DE TIEMPOS

#### 3.3.3.1.- FASE DE SECADO

- **Parámetros que se mantienen constantes:**
  - **Elemento:** Manganeso
  - **Matriz:** Muestra biológica
  - **Modo Instrumento:** Absorbancia.
  - **Modo calibración:** Concentración
  - **Modo medida:** Altura del pico
  - **posición lámpara:**3
  - **Longitud de onda del pico de absorbancia:** 279,5nm
  - **Introducción de muestra:** Automática
  - **Tiempo de medida:** 1 segundo
  - **Replicas:** 3
  - **Activada la corrección de fondo**
  - **Máximo de absorbancia:** 2,00
  - **Señal de la lámpara:** 0,740
  - **Fotomultiplicador:** 460,8 voltios
  - **Tubo de grafito:** SIN plataforma L'vov
  - **Intensidad de la lámpara:** 4 mA
  - **Ancho de rendija:** Normal
  - **Altura de rendija:** 0,1nm

**Tabla 3-9:** Programa de temperaturas, tiempo, flujo de gas y lectura. (Tiempo de secado variable)

	Pasos	T (°C)	t (s)	Flujo gas (L/min)	Gas	Lectura
<b>SECADO</b>	1	<b>94</b>		3	Argón	NO
	2	<b>105</b>		3	Argón	NO
<b>CALCINACIÓN</b>	3	<b>120</b>	20	3	Argón	NO
	4	<b>300</b>	5	3	Argón	NO
	5	<b>400</b>	20	3	Argón	NO
	6	<b>1100</b>	5	3	Argón	NO
	7	<b>1100</b>	10	3	Argón	NO
	8	<b>1100</b>	2	0	-	NO
<b>ATOMIZACIÓN</b>	9	<b>2500</b>	0,7	0	-	SI
	10	<b>2500</b>	1	0	-	SI
<b>LAVADO</b>	11	2500	1	3	Argón	NO

• **Parámetros variables:**

- Tiempos de secado, pasos 1 y 2

Se mide la señal media de absorbancia correspondiente a 25 µL de una solución formada por:

- 10 µL de una solución de 20µg Mn/L en HNO<sub>3</sub> al 1%
- 10µL de una mezcla de sangre total
- 5µL de agua milliQ (blanco)

Variando los tiempos de secado en un  $\pm 10\%$  de los tiempos de secado de partida (paso 1: 5 segundos, paso 2: 40 segundos) y manteniendo constantes los tiempos de calcinación, atomización y lavado.

**Tabla 3-10:** Señales de absorbancia para distintos tiempos de secado.

t SECADO (SEGUNDOS)	ABS. MEDIA	DESV. ESTÁNDAR
Paso 1: 4,5	0,671	8,5
Paso 2: 36		
Paso 1: 5	0,723	4,9
Paso 2: 40		
Paso 1 : 5,5	0,635	9,9
Paso 2 : 44		

Como se puede observar en la tabla 3-10 la mayor señal de absorbancia se obtiene bajo las condiciones siguientes:

- Tiempo de secado paso 1: 5 segundos
- Tiempo de secado paso 2: 40 segundos

Se observa que las señales de absorbancia que estamos obteniendo hasta el momento no son reproducibles, por lo que antes de continuar con la optimización de los tiempos se decide introducir nitrato de paladio como **modificador de matriz**.

El paladio ha sido propuesto como modificador universal [258] , ya que favorece un aumento de la estabilidad térmica del analito , permitiendo aumentar la temperatura de atomización sin pérdidas apreciables de analito, obteniéndose bajos límites de detección , baja señal de absorción de fondo, una disminución de la desviación estándar y una mejor exactitud y precisión del método de análisis. Se propone como mecanismo de acción de Pd, que el analito se disuelve en el óxido de Pd ó en el Pd fundido a baja temperatura, formando otros compuestos, y que la etapa determinante del mecanismo de atomización del analito es su difusión desde el paladio fundido.

Se mide la señal media de absorbancia correspondiente a 30 µL de una solución formada por:

- 5 µL de una solución de 20µg Mn/L en HNO<sub>3</sub> al 1%
- 10µL de una mezcla de sangre total
- 10 µL de Modificador de matriz nitrato de paladio
- 5µL de agua milliQ (blanco)

Utilizamos distintas concentraciones de modificador preparadas a partir de Pd (NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>/HNO<sub>3</sub> Ca. 15% Merck

**Tabla 3-11:** Influencia del modificador en el pico de absorbancia.

MODIFICADOR	ABSORBANCIA MEDIA	DESVIACIÓN ESTÁNDAR
Sin Modificador	0,171	2
0,125%	0,180	1,7
0,25%	0,181	0,9
0,5%	0,180	0,9
1%	0,183	1,7
2%	0,190	1,3
4%	0,165	1,9
8%	0,138	0,8

A partir de ahora se utilizará como modificador de matriz 10 µL de **nitrate de paladio al 2%**, ya que como se pueda apreciar en tabla 3-11, a esta concentración del modificador se obtiene la mejor señal de absorbancia.

Consultado la bibliografía además de la introducción del modificador se decide precipitar las proteínas de la matriz con HNO<sub>3</sub> para evitar que se depositen en el tubo de grafito residuos orgánicos que obstruyen el paso de la luz y originan señales de absorbancia no reproducibles [257] .

También se sustituye el agua Milli Q del blanco por HNO<sub>3</sub> al 5%.

### **Tratamiento de la muestra para precipitar las proteínas**

En un tubo Ependorf se añade:

- 250µL de mezcla de sangre total
- 50µL de ácido nítrico diluído a ½
- 200µL de agua Milli-Q®.

Se agita la mezcla en un vortex® y se centrifuga 3 minutos a 2500 revoluciones. A continuación se recoge el sobrenadante obtenido.

Con estos cambios, se vuelven a optimizar los tiempos de secado.

#### **• Parámetros que se mantienen constantes:**

- **Elemento:** Manganese
- **Matriz:** Muestra biológica
- **Modo Instrumento:** Absorbancia.
- **Modo calibración:** Concentración
- **Modo medida:** Altura del pico
- **posición lámpara:**3
- **Longitud de onda del pico de absorbancia:** 279,5nm
- **Introducción de muestra:** Automática
- **Tiempo de medida:** 1 segundo
- **Replicas:** 3

- **Activada la corrección de fondo**
- **Máximo de absorbancia:** 2,00
- **Señal de la lámpara:** 0,740
- **Fotomultiplicador:** 460,8 voltios
- **Tubo de grafito:** SIN plataforma L'vov
- **Intensidad de la lámpara:** 4 mA
- **Ancho de rendija:** Normal
- **Altura de rendija:** 0,1nm

**Tabla 3-12:** Programa de temperaturas, tiempo, flujo de gas y lectura. (Tiempo de secado variable).

	Pasos	T (°C)	t (s)	Flujo gas (L/min)	Gas	Lectura
<b>SECADO</b>	1	<b>94</b>		3	Argón	NO
	2	<b>105</b>		3	Argón	NO
<b>CALCINACIÓN</b>	3	<b>120</b>	20	3	Argón	NO
	4	<b>300</b>	5	3	Argón	NO
	5	<b>400</b>	20	3	Argón	NO
	6	<b>1100</b>	5	3	Argón	NO
	7	<b>1100</b>	10	3	Argón	NO
	8	<b>1100</b>	2	0	-	NO
<b>ATOMIZACIÓN</b>	9	<b>2500</b>	0,7	0	-	SI
	10	<b>2500</b>	1	0	-	SI
<b>LAVADO</b>	11	2500	1	3	Argón	NO

- **Parámetros variables:**

- Tiempos de secado, pasos 1 y 2

A continuación se mide la señal media de absorbancia correspondiente a 30 µL de una solución formada por:

- 10µL del mezcla de sangre total previa precipitación de proteínas
- 5 µL de una solución estándar de Mn de 20µg/L en HNO<sub>3</sub> al 1%
- 5µL de ácido nítrico al 5% (blanco)
- 10 µL de Nitrato de Pd al 2% (modificador)

Variando los tiempos de secado en un  $\pm 10\%$  de los tiempos de secado de partida (paso 1: 5 segundos, paso 2: 40 segundos) y manteniendo constantes los tiempos de calcinación, atomización y lavado.

**Tabla 3-13:** Señales de absorbancia para distintos tiempos de secado, con la introducción del modificador Nitrato de Pd.

t SECADO (SEGUNDOS)	ABS. MEDIA	DESV. ESTÁNDAR
Paso 1: 4,5	0,482	1,5
Paso 2: 36		
Paso 1: 5	0,485	1
Paso 2: 40		
Paso 1 : 5,5	0,469	3,0
Paso 2 : 44		

Como se puede observar en la tabla anterior la mayor señal de absorbancia se obtiene bajo las condiciones siguientes:

- Tiempo de secado paso 1: 5 segundos
- Tiempo de secado paso 2: 40 segundos

### 3.3.3.2.- FASE CALCINACIÓN

- **Parámetros que se mantienen constantes:**
  - **Elemento:** Manganeso
  - **Matriz:** Muestra biológica
  - **Modo Instrumento:** Absorbancia.
  - **Modo calibración:** Concentración
  - **Modo medida:** Altura del pico
  - **posición lámpara:**3
  - **Longitud de onda del pico de absorbancia:** 279,5nm
  - **Introducción de muestra:** Automática
  - **Tiempo de medida:** 1 segundo
  - **Replicas:** 3
  - **Activada la corrección de fondo**



- **Máximo de absorbancia:** 2,00
- **Señal de la lámpara:** 0,740
- **Fotomultiplicador:** 460,8 voltios
- **Tubo de grafito:** SIN plataforma L'vov
- **Intensidad de la lámpara:** 4 mA
- **Ancho de rendija:** Normal
- **Altura de rendija:** 0,1nm

*Tabla 3-14: Programa de temperaturas, tiempo, flujo de gas y lectura. (Tiempo de calcinación variable)*

	Pasos	T (°C)	t (s)	Flujo gas (L/min)	Gas	Lectura
SECADO	1	94	5	3	Argón	NO
	2	105	40	3	Argón	NO
CALCINACIÓN	3	120		3	Argón	NO
	4	300		3	Argón	NO
	5	400		3	Argón	NO
	6	1100		3	Argón	NO
	7	1100		3	Argón	NO
	8	1100		0	-	NO
ATOMIZACIÓN	9	2500	0,7	0	-	SI
	10	2500	1	0	-	SI
LAVADO	11	2500	1	3	Argón	NO

- **Parámetros variables:**
  - Tiempos de calcinación de los pasos del 3 al 8.

A continuación se mide la señal media de absorbancia correspondiente a 30 µL de una solución formada por:

- 10µL del mezcla de sangre total previa precipitación de proteínas
- 5 µL de una solución estándar de Mn de 20µg/L en HNO<sub>3</sub> al 1%
- 5µL de ácido nítrico al 5% (blanco)
- 10 µL de Nitrato de Pd al 2% (modificador)

Variando los tiempos de calcinación en un  $\pm 10\%$  de los tiempos de partida (paso3: 20s, paso 4: 5s, paso 5: 20s, paso 6: 5s, paso 7: 10s, paso 8: 2s) y manteniendo constantes los el tiempo de secado ya optimizado y los tiempos de atomización.

**Tabla 3-15:** Señales de absorbancia para distintos tiempos de calcinación.

<b>t CALCINACIÓN (S)</b>	<b>ABS. MEDIA</b>	<b>DESV. ESTÁNDAR</b>
Paso 3: 10	<b>0,510</b>	<b>7,9</b>
Paso 4: 2,5		
Paso 5: 10		
Paso 6: 2,5		
Paso 7: 5		
Paso 8: 1,0		
Paso 3: 12	<b>0,813</b>	<b>8,3</b>
Paso 4: 3		
Paso 5: 12		
Paso 6: 3		
Paso 7: 6		
Paso 8: 1,2		
Paso 3: 14	<b>0,530</b>	<b>7,7</b>
Paso 4: 3,5		
Paso 5: 14		
Paso 6: 3,5		
Paso 7: 7		
Paso 8: 1,4		
Paso 3: 16	<b>0,516</b>	<b>8,1</b>
Paso 4: 4		
Paso 5: 16		
Paso 6: 4		
Paso 7: 8		
Paso 8: 1,6		
Paso 3: 18	<b>0,507</b>	<b>2,4</b>
Paso 4: 4,5		
Paso 5: 18		
Paso 6: 4,5		
Paso 7: 9		
Paso 8: 1,8		
Paso 3:20	<b>0,485</b>	<b>8,1</b>
Paso 4: 5		
Paso 5: 20		
Paso 6: 5		
Paso 7: 10		
Paso 8: 2		

Como se puede observar en la tabla anterior la mayor señal de absorbancia se obtiene bajo las condiciones siguientes:

- Tiempo de calcinación paso 3: 12 segundos
- Tiempo de calcinación paso 4: 3 segundos
- Tiempo de calcinación paso 5: 12 segundos
- Tiempo de calcinación paso 6: 3 segundos
- Tiempo de calcinación paso 7: 6 segundos
- Tiempo de calcinación paso 8: 1,2 segundos

### **3.3.3.3.- FASE ATOMIZACION**

- **Parámetros que se mantienen constantes:**
  - **Elemento:** Manganeso
  - **Matriz:** Muestra biológica
  - **Modo Instrumento:** Absorbancia.
  - **Modo calibración:** Concentración
  - **Modo medida:** Altura del pico
  - **posición lámpara:**3
  - **Longitud de onda del pico de absorbancia:** 279,5nm
  - **Introducción de muestra:** Automática
  - **Tiempo de medida:** 1 segundo
  - **Replicas:** 3
  - **Activada la corrección de fondo**
  - **Máximo de absorbancia:** 2,00
  - **Señal de la lámpara:** 0,740
  - **Fotomultiplicador:** 460,8 voltios
  - **Tubo de grafito:** SIN plataforma L'vov
  - **Intensidad de la lámpara:** 4 mA
  - **Ancho de rendija:** Normal

- **Altura de rendija:** 0,1mm

**Tabla 3-16:** Programa de temperaturas, tiempo, flujo de gas y lectura. (Tiempo de atomización variable)

	Pasos	T (°C)	t (s)	Flujo gas (L/min)	Gas	Lectura
<b>SECADO</b>	1	<b>94</b>	<b>5</b>	3	Argón	NO
	2	<b>105</b>	<b>40</b>	3	Argón	NO
<b>CALCINACIÓN</b>	3	<b>120</b>	<b>12</b>	3	Argón	NO
	4	<b>300</b>	<b>3</b>	3	Argón	NO
	5	<b>400</b>	<b>12</b>	3	Argón	NO
	6	<b>1100</b>	<b>3</b>	3	Argón	NO
	7	<b>1100</b>	<b>6</b>	3	Argón	NO
	8	<b>1100</b>	<b>1,2</b>	0	-	NO
<b>ATOMIZACIÓN</b>	9	<b>2500</b>		0	-	SI
	10	<b>2500</b>		0	-	SI
<b>LAVADO</b>	11	2500	1	3	Argón	NO

- **Parámetros variables:**
  - Tiempos de atomización pasos 9 y 10

A continuación se mide la señal media de absorbancia correspondiente a 30 µL de una solución formada por:

- 10µL del mezcla de sangre total previa precipitación de proteínas
- 5 µL de una solución estándar de Mn de 20µg/L en HNO<sub>3</sub> al 1%
- 5µL de ácido nítrico al 5% (blanco)
- 10 µL de Nitrato de Pd al 2% (modificador)

Variando los tiempos de atomización en un  $\pm 10\%$  de los tiempos de partida (paso9: 0,7s, paso 10: 1s) y manteniendo constantes los el tiempo de secado y calcinación ya optimizados.

**Tabla 3-17:** Señales de absorbancia para distintos tiempos de atomización

t ATOMIZACIÓN (S)	ABS. MEDIA	DESV. ESTÁNDAR
Etapa9: 0,63	0,598	8
Etapa 10: 0,9		
Etapa9: 0,7	0,595	3,6
Etapa10: 1,0		
<b>Etapa9: 0,8</b>	<b>0,616</b>	<b>1,4</b>
<b>Etapa10: 1,4</b>		

Como se puede observar en la tabla anterior la mayor señal de absorbancia se obtiene bajo las condiciones siguientes:

- Tiempo de atomización paso 9: 0,8 segundos
- Tiempo de atomización paso 10: 1,4 segundos

### 3.3.4.- INTRODUCCIÓN DE LA PLATAFORMA L'VOV:

Hasta el momento estábamos trabajando sin plataforma. La muestra se depositaba directamente en la pared del horno de grafito y el analito se vaporizaba mientras la temperatura de las paredes aumentaba.

Este proceso está caracterizado por una excelente sensibilidad analítica, sin embargo nuestros picos son poco reproducibles por la formación de compuestos volátiles del analito, los cuales permanecen estables en el rango de temperatura en el cual se produce la atomización.

Para reducir las interferencias de los compuestos más volátiles se decide introducir la plataforma L'vov.

En estas condiciones la muestra se deposita en la plataforma en lugar de en la pared del tubo de grafito. Durante la atomización la temperatura de la plataforma se retrasa varios cientos de grados respecto a la del horno, de tal manera que los compuestos volátiles del analito no son vaporizados hasta que la pared del horno ha alcanzando la temperatura del estado estacionario. En consecuencia la atomización tiene lugar en un medio en que no se produce un cambio tan rápido de temperatura y de este modo se obtienen picos más reproducibles al producirse menos interferencias químicas.

Se mide la señal media de absorbancia correspondiente a 30  $\mu$ L de una solución formada por:

- 10  $\mu$ L del mezcla de sangre total previa precipitación de proteínas
- 5  $\mu$ L de una solución estándar de Mn de 20  $\mu$ g/L en HNO<sub>3</sub> al 1%
- 5  $\mu$ L de ácido nítrico al 5% (blanco)
- 10  $\mu$ L de Nitrato de Pd al 2% (modificador)

Al introducir la plataforma optimizo también el haz de luz a **556,2 voltios**.

En las condiciones de trabajo optimizadas hasta el momento y utilizando **plataforma L'vov**:

- **Elemento:** Manganeseo
- **Matriz:** Muestra biológica
- **Modo Instrumento:** Absorbancia.
- **Modo calibración:** Concentración
- **Modo medida:** Altura del pico
- **posición lámpara:**3
- **Longitud de onda del pico de absorbancia:** 279,5nm
- **Introducción de muestra:** Automática
- **Tiempo de medida:** 1 segundo
- **Replicas:** 3
- **Activada la corrección de fondo**
- **Máximo de absorbancia:** 2,00
- **Señal de la lámpara:** 0,740
- **Fotomultiplicador:** 556,2 voltios
- **Tubo de grafito:** CON plataforma L'voy
- **Intensidad de la lámpara:** 4 mA
- **Ancho de rendija:** Normal
- **Altura de rendija:** 0,1nm

*Tabla 3-18: Programa de temperaturas, tiempo, flujo de gas y lectura optimizado*

	Pasos	T (°C)	t (s)	Flujo gas (L/min)	Gas	Lectura
<b>SECADO</b>	1	<b>94</b>	<b>5</b>	3	Argón	NO
	2	<b>105</b>	<b>40</b>	3	Argón	NO
<b>CALCINACIÓN</b>	3	<b>120</b>	<b>12</b>	3	Argón	NO
	4	<b>300</b>	<b>3</b>	3	Argón	NO
	5	<b>400</b>	<b>12</b>	3	Argón	NO
	6	<b>1100</b>	<b>3</b>	3	Argón	NO
	7	<b>1100</b>	<b>6</b>	3	Argón	NO
	8	<b>1100</b>	<b>1,2</b>	0	-	NO
<b>ATOMIZACIÓN</b>	9	<b>2500</b>	<b>0,8</b>	0	-	SI
	10	<b>2500</b>	<b>1,4</b>	0	-	SI
<b>LAVADO</b>	11	2500	1	3	Argón	NO

Se obtiene una señal media de **absorbancia** de **0,450** con una **desviación estándar** de **4,0**.

La señal de absorbancia del pico se encuentra retrasada como era de esperar, por lo que perdemos sensibilidad.

Se decide introducir nuevos cambios en el método.

- Lo primero que se hace **es reducir el tiempo del paso 8** de 1,2 segundos a **0,5 segundos**, acortando el tiempo se consigue una lectura de todo el pico en el rango de lectura.
- Se suben las temperaturas de calcinación y atomización
- **Se medirá área de pico** en lugar de altura de pico. La altura de pico se utiliza para obtener mayor precisión cuando se trabaja en horno de grafito sin plataforma. Pero cuando los picos son anchos debido a interferencias químicas y se introduce plataforma L'vov se recomienda medir área de pico. Durante la atomización la plataforma se calienta a una velocidad más lenta que la pared del horno y para los elementos menos volátiles esto produce una pérdida de sensibilidad cuando medimos altura de pico. La medida del área de pico en atomización con plataforma presenta la ventaja de hacer más evidente la reducción de las interferencias de matriz [268].

A partir de ahora se trabajará en **condiciones STPF**:

- Electrónica rápida
- Integración de señal.
- Exacta corrección de fondo (efecto Zeeman).
- Calentamiento rápido del horno.
- Plataforma de L'vov y tubos de grafito con recubrimiento pirolítico.
- Parada de gas en la atomización.
- Empleo de modificadores de matriz.

### 3.3.5.- INTRODUCCIÓN DE CALIBRACIÓN POR ADICIONES ESTÁNDAR

Se siguen obteniendo picos poco reproducibles debidos probablemente a la heterogeneidad de matriz. Para solucionar este problema se introducen nuevos cambios en el método de medida

Se cambia el método de calibración acuosa por un **método de calibración por adiciones estándar** para tener homogeneidad de matriz entre los calibradores y las muestras; ya que la pendiente de la calibración acuosa varía en más de un 10% respecto a la pendiente de calibración por adiciones de estándar como se demuestra a continuación.

- **Parámetros que se mantienen constantes:**
  - **Elemento:** Manganeso
  - **Matriz:** Muestra biológica
  - **Modo Instrumento:** Absorbancia
  - **Modo calibración:** Adiciones estándar
  - **Modo medida:** Área del pico
  - **posición lámpara:**3
  - **Longitud de onda del pico de absorbancia:** 279,5nm
  - **Introducción de muestra:** Automática
  - **Tiempo de medida:** 1 segundo
  - **Replicas:** 3
  - **Activada la corrección de fondo**
  - **Máximo de absorbancia:** 2,00
  - **Señal de la lámpara:** 0,740
  - **Fotomultiplicador:** 556,2 voltios
  - **Tubo de grafito:** CON plataforma L'vov
  - **Intensidad de la lámpara:** 4 mA
  - **Ancho de rendija:** normal
  - **Altura de rendija:** 0,1nm



○ Condiciones STPF

**Tabla 3-19:** Programa de temperaturas, tiempo, flujo de gas y lectura con nuevas modificaciones en los tiempos y temperaturas de atomización.

	Pasos	T (°C)	t (s)	Flujo gas (L/min)	Gas	Lectura
SECADO	1	94	5	3	Argón	NO
	2	105	40	3	Argón	NO
CALCINACIÓN	3	170	12	3	Argón	NO
	4	600	3	3	Argón	NO
	5	700	12	3	Argón	NO
	6	1400	3	3	Argón	NO
	7	1400	6	3	Argón	NO
	8	1400	0,5	0	-	NO
ATOMIZACIÓN	9	2600	0,8	0	-	SI
	10	2600	1,4	0	-	SI
LAVADO	11	2600	1	3	Argón	NO

En primer lugar se realizan 3 calibraciones por el método de adiciones estándar y se obtiene la pendiente de cada una de ellas, calculando la recta de regresión.

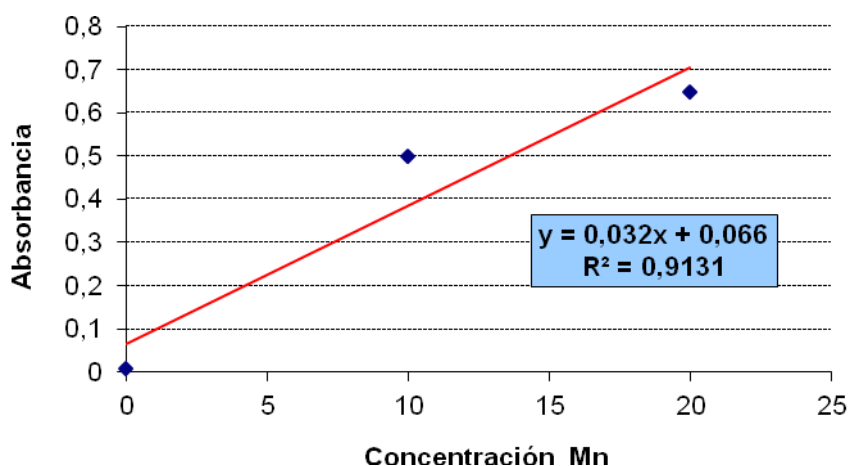
**Tabla 3-20:** Programación del muestreador calibración por adiciones estándar

PARAMETROS MUESTRAS, VOLÚMENES (μL)				
	ESTANDAR	MEZCLA SANGRE	BLANCO	MODIFICADOR
BLANCO	0	0	20	10
ADICIÓN 10(μg/L)	5	10	5	10
ADICIÓN 20(μg/L)	10	10	0	10

**Tabla 3-21:** Primera calibración por adiciones estándar

Mn (μg/L)	Absorbancia
0	0,009
10	0,5
20	0,649

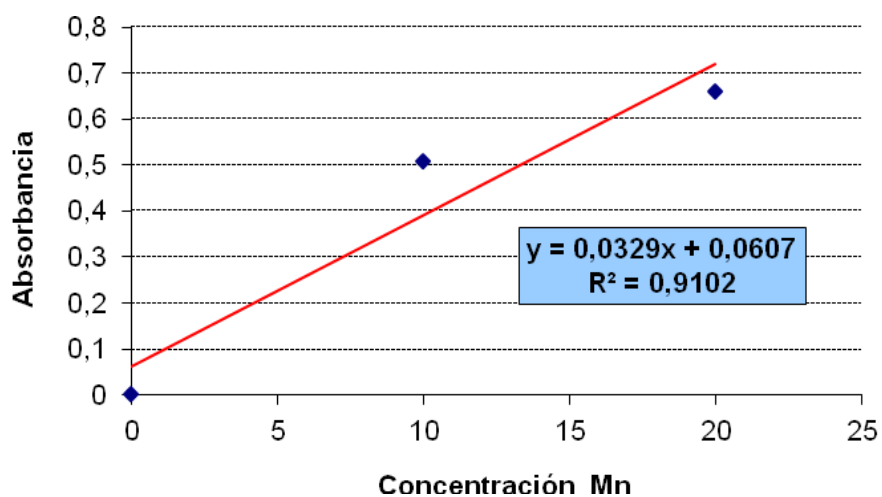
*Ilustración 3-3: Primera calibración por adiciones estándar*



*Tabla 3-22: Segunda calibración por adiciones estándar*

Mn (µg/L)	Absorbancia
0	0,001
10	0,509
20	0,659

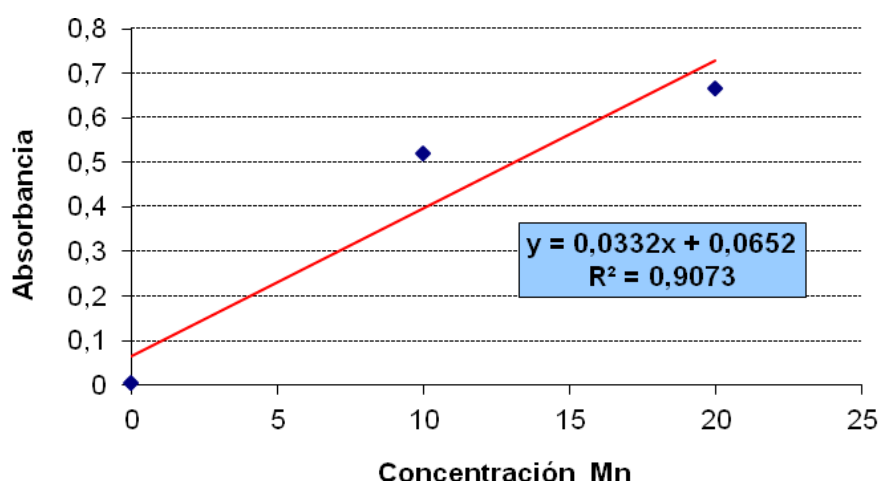
*Ilustración 3-4: Segunda calibración por adiciones estándar*



**Tabla 3-23:** Tercera calibración por adiciones estándar

Mn (µg/L)	Absorbancia
0	0,004
10	0,519
20	0,667

**Ilustración 3-5** Tercera calibración por adiciones estándar



A continuación lugar se realizan 3 calibraciones acuosas y se obtiene la pendiente de cada una de ellas calculando la recta de regresión con los datos obtenidos.

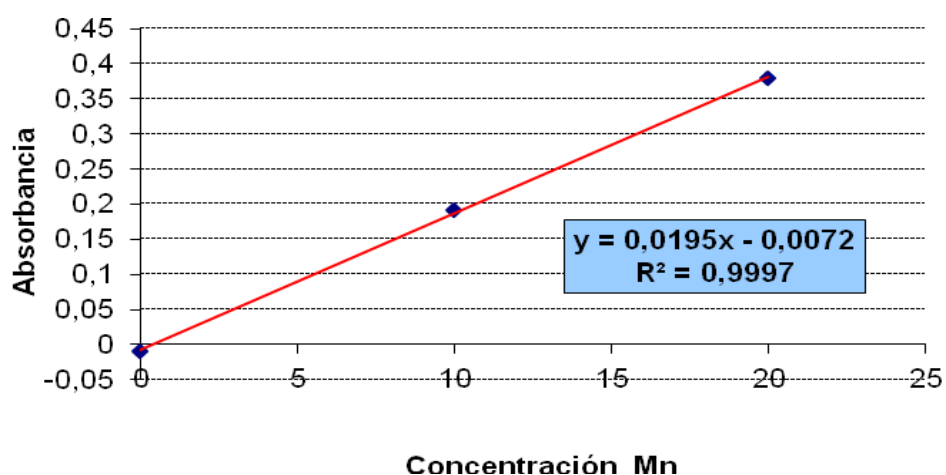
**Tabla 3-24:** Programación del muestreador calibración acuosa

PARAMETROS MUESTRAS, VOLUMENES (µL)				
	ESTANDAR	MUESTRA	BLANCO	MODIFICADOR
BLANCO	0	0	20	10
ADICIÓN 10(µg/L)	5	0	15	10
ADICIÓN 20(µg/L)	10	0	10	10

**Tabla 3-25:** Primera calibración acuosa

Mn (µg/L)	Absorbancia
0	-0,009
10	0,191
20	0,38

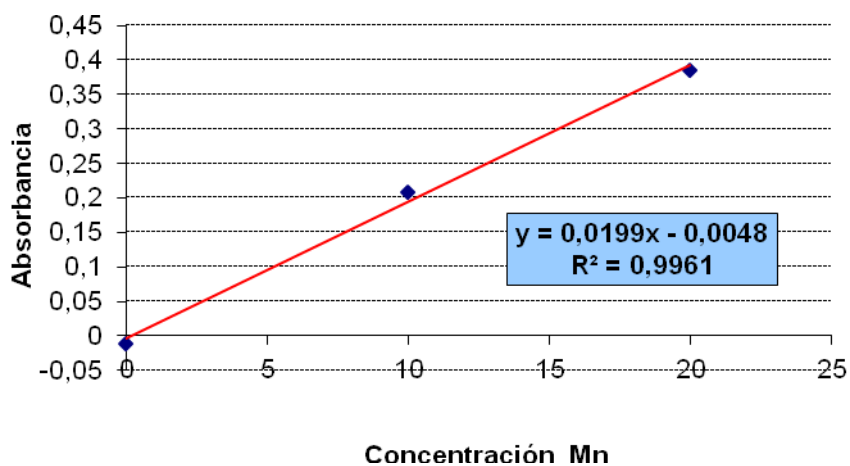
*Ilustración 3-6: Primera calibración acuosa*



*Tabla 3-26: Segunda calibración acuosa*

Mn (µg/L)	Absorbancia
0	-0,012
10	0,208
20	0,385

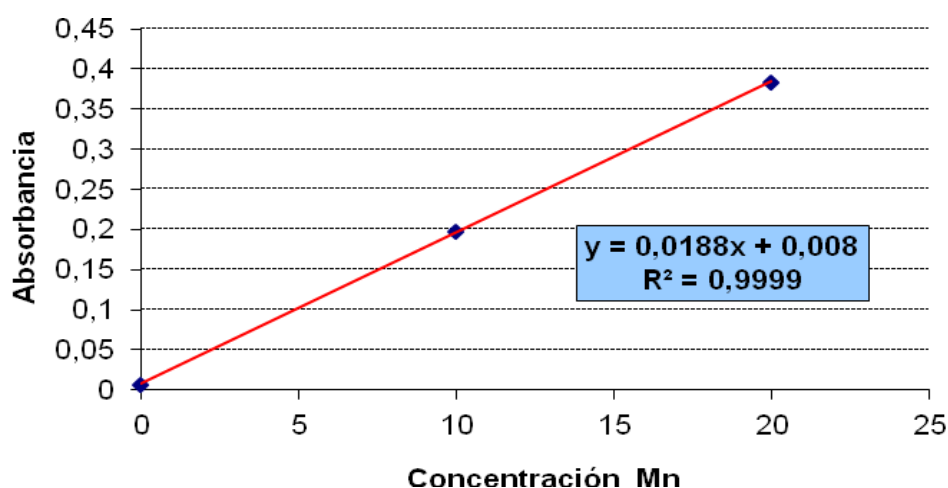
*Ilustración 3-7: Segunda calibración acuosa*



*Tabla 3-27: Tercera calibración acuosa*

Mn (µg/L)	Absorbancia
0	0,007
10	0,198
20	0,383

**Ilustración 3-8:** Tercera calibración acuosa



Al comparar la media de las **pendientes de calibración estándar** (pendiente 1: **0,0327**) y la media de las **pendientes de calibración acuosa** (pendiente 2: **0,0194**) se observa una **diferencia de medias de 0,0133**.

**Tabla 3-28:** Pendientes de las calibraciones acuosas y por adición estándar

PENDIENTES	TIPO CALIBRACIÓN
0,032	1
0,0329	1
0,0332	1
0,0195	2
0,0199	2
0,0188	2

1: calibración estándar

2: calibración acuosa

**Tabla 3-29:** Estadísticos de grupo para las calibraciones acuosas y por adición estándar.

	TIPO CALIBRACIÓN	N	Media	Desviación típ.
PENDIENTE	1,0000	3	0,032700	0,0006245
	2,0000	3	0,019400	0,0005568

**Tabla 3-30:** Prueba t para igualdad de medias de las pendientes

	Prueba T para la igualdad de medias						
	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	Error típ. de la diferencia	95% Intervalo de confianza para la diferencia	
Se han asumido varianzas iguales	27,534	4	<b>0,000</b>	<b>0,0133000</b>	0,0004830	0,0119588	0,0146412

Por lo tanto las medias son diferentes con una significación estadística bilateral  $p < 0,000$ , y la diferencia es superior al 10% de la pendiente, lo que supone un cambio en la sensibilidad, por lo que pasamos a usar calibraciones estándar.

### 3.3.6.- PROGRAMA OPTIMIZADO

Se mide la señal media de absorbancia correspondiente a 30  $\mu\text{L}$  de una solución formada por:

- 10 $\mu\text{L}$  del mezcla de sangre total previa precipitación de proteínas
- 5  $\mu\text{L}$  de una solución estándar de Mn de 20 $\mu\text{g/L}$  en  $\text{HNO}_3$  al 1%
- 5 $\mu\text{L}$  de ácido nítrico al 5% (blanco)
- 10  $\mu\text{L}$  de Nitrato de Pd al 2% (modificador)
- **Condiciones optimizadas de trabajo:**
  - **Elemento:** Manganeso
  - **Matriz:** Muestra biológica
  - **Modo Instrumento:** Absorbancia.
  - **Modo calibración:** Adiciones estándar
  - **Modo medida:** Área del pico
  - **posición lámpara:**3
  - **Longitud de onda del pico de absorbancia:** 279,5nm
  - **Introducción de muestra:** Automática

- **Tiempo de medida:** 1 segundo
- **Replicas:** 3
- **Activada la corrección de fondo**
- **Máximo de absorbancia:** 2,00
- **Señal de la lámpara:** 0,740
- **Fotomultiplicador:** 556,2 voltios
- **Tubo de grafito:** CON plataforma L'vov
- **Intensidad de la lámpara:** 4 mA
- **Ancho de rendija:** normal
- **Altura de rendija:** 0,1nm
- **Modificador:** Nitrato de Pd 2%
- **Condiciones STPF**

*Tabla 3-31: Programa del muestreador optimizado.*

PARAMETROS MUESTRAS, VOLÚMENES (μL)				
	ESTANDAR	MUESTRA	BLANCO	MODIFICADOR
BLANCO	-	-	20	10
ADICIÓN 10(μg/L)	5	10	5	10
ADICIÓN 20(μg/L)	10	10	0	10
MUESTRA	-	10	10	10

*Tabla 3-32: Programa de temperaturas, tiempo, flujo de gas optimizado*

	Pasos	T (°C)	t (s)	Flujo gas (L/min)	Gas	Lectura
SECADO	1	194	5	3	Argón	NO
	2	205	40	3	Argón	NO
CALCINACIÓN	3	170	12	3	Argón	NO
	4	600	3	3	Argón	NO
	5	700	12	3	Argón	NO
	6	1400	3	3	Argón	NO
	7	1400	6	3	Argón	NO
	8	1400	0,5	0	-	NO
ATOMIZACIÓN	9	2600	0,8	0	-	SI
	10	2600	1,4	0	-	SI
LAVADO	11	2600	1	3	Argón	NO

En estas condiciones de trabajo se obtiene los picos más reproducibles hasta el momento ( $A = 0,227$ ,  $SD = 1,4$ ), por lo que se da por finalizada la optimización del método.

### 3.4.- VALIDACIÓN DEL MÉTODO.

#### 3.4.1.- LINEALIDAD

Para la determinación de un intervalo de trabajo comenzamos con la comprobación de linealidad en el mismo.

A partir de una disolución patrón de Mn de concentración 150  $\mu\text{g/L}$  se toman 9 puntos de calibración de concentraciones crecientes hasta perder la linealidad con 3 réplicas en cada uno.

**Tabla 3-33:** Programación del muestreador para estudio de la linealidad

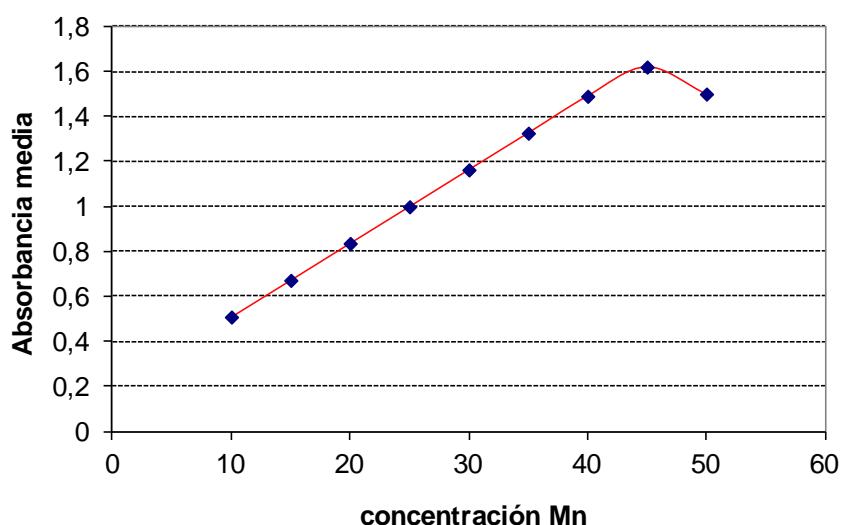
Concentración ( $\mu\text{g/L}$ )	Volumen ( $\mu\text{L}$ ) estándar	Volumen ( $\mu\text{L}$ ) modificador	Volumen ( $\mu\text{L}$ ) blanco	Volumen ( $\mu\text{L}$ ) Mezcla sangre total
10	2	10	8	10
15	3	10	7	10
20	4	10	6	10
25	5	10	5	10
30	6	10	4	10
35	7	10	3	10
40	8	10	2	10
45	9	10	1	10
50	10	10	0	10

**Tabla 3-34:** Absorbancias obtenidas en el estudio de linealidad

Concentración de Mn ( $\mu\text{g/L}$ )	Señal de absorbancia media
10	0,509
15	0,672
20	0,836
25	0,999
30	1,163
35	1,326
40	1,490
45	1,620
50	1,500

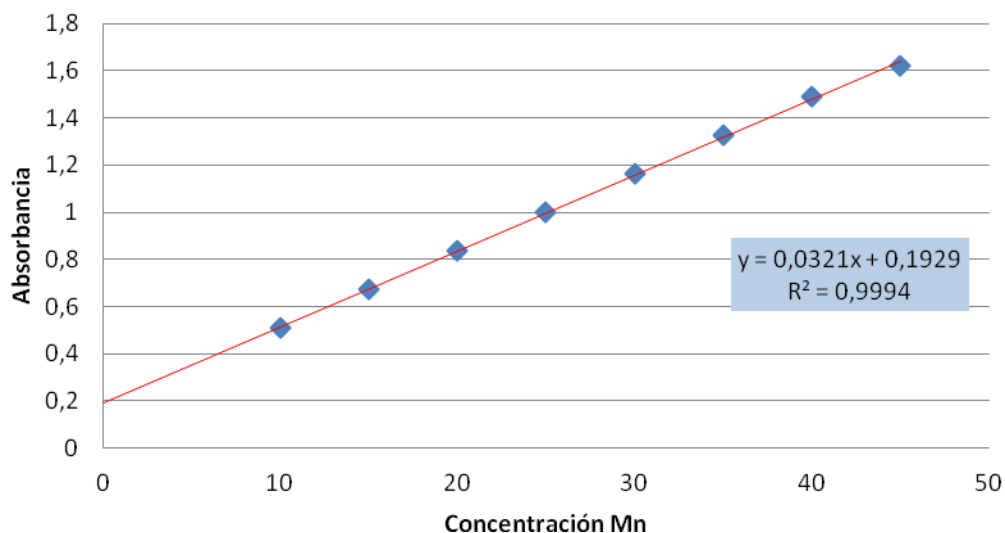


**Ilustración 3-9:** Estudio de linealidad



Como se observa en la gráfica, a partir de una concentración de Mn mayor de 45 µg/L se pierde la linealidad.

**Ilustración 3-10:** Recta de regresión en el estudio de la linealidad



El método práctico de verificar la linealidad supone que la técnica está precisamente calibrada. En la práctica diaria la existencia de la incertidumbre de calibración hace que los distintos puntos de la recta de calibración no están perfectamente alineados. Lo que se hace es trazar la recta de regresión como línea de identidad y trazar el polígono de intolerancia con la incertidumbre. La proyección en el eje de ordenadas del punto a partir del cual se excede el error de tolerancia es en el que se establece el límite de linealidad.

Los resultados obtenidos a concentraciones superiores a 45 µg Mn/ L deben reprocesarse tras la correspondiente dilución.

### 3.4.2.- LÍMITE DE DETECCIÓN

Dada la gran dificultad de disponer de una sangre libre de Mn se procede a estimar el límite de detección con un blanco de calibración.

A tal efecto se determinan 30 blancos de calibración.

**Tabla 3-35:** Estudio Límite de detección y Límite de Cuantificación

N	Absorbancia	N	Absorbancia	N	Absorbancia	S
1	-0,018	11	-0,02	21	-0,015	0,00355967
2	-0,014	12	-0,017	22	-0,013	LC
3	-0,016	13	-0,016	23	-0,018	1,11239748
4	-0,017	14	-0,018	24	-0,017	3,3*S
5	-0,017	15	-0,014	25	-0,016	0,01174692
6	-0,018	16	-0,018	26	-0,015	$\bar{m}$
7	-0,017	17	-0,018	27	-0,007	0,032
8	-0,018	18	-0,013	28	-0,013	LD
9	-0,017	19	-0,018	29	-0,005	0,36709117
10	-0,017	20	-0,017	30	-0,007	

Para estimar el **Límite de Detección (LD)** multiplicamos la desviación estándar (S) por 3,3 y la dividimos por la media de las pendientes ( $\bar{m}$ ) de calibración obteniéndose un resultado de **0,37 µg/L**.

Por lo tanto, es de esperar que el **Límite de Cuantificación (LC)** se encuentre cercano a  $(10 \cdot S) / \bar{m} = 1,1 \mu\text{g/L}$ .

### 3.4.3.- EVALUACIÓN DE PRECISIÓN Y EXACTITUD

Para la evaluación simultánea de la exactitud y la precisión se analizan 2 controles certificados (Controles de Seronorm TM Trace Elements SERUM niveles 1 y 2), de concentraciones crecientes de Mn durante 15 días diferentes y realizando todos los días una calibración diferente.

Los controles antes de ser analizados se les hacen el mismo tratamiento que las muestras con ácido nítrico para precipitar las proteínas.

**Tabla 3-36:** Evaluación de la Precisión y Exactitud

DIA	Control bajo( 8,00-13,3)µg/L		Control alto( 12,9-15,1)µg/L	
	xi	$\bar{x}$	xi	$\bar{x}$
1	9,50		13,31	
1	9,44	9,52667	13,28	13,43667
1	9,64		13,72	
2	10,46		14,2	
2	10,35	10,67333	14,66	14,47667
2	11,21		14,57	
3	9,2		13,51	
3	9,07	9,343333	13,2	13,43667
3	9,76		13,6	
4	10,5		13	
4	10,02	10,16667	13,5	13,56667
4	9,98		14,2	
5	10,16		12,9	
5	10,2	10,19333	14,3	13,63333
5	10,22		13,7	
6	9,98		14,51	
6	10,2	10,16	15	14,73667
6	10,3		14,7	
7	10,05		13,5	
7	10,21	10,18667	14,2	13,82333
7	10,3		13,77	
8	10,08		15,1	
8	10,18	10,11667	14,9	14,66667
8	10,09		14	
9	9,98		13,5	
9	9,98	9,993333	14,9	14,06667
9	10,02		13,8	
10	10,21		14,3	
10	10,1	10,14333	13,6	13,93333
10	10,12		13,9	
11	10,08		14,37	
11	10,5	10,29333	14,6	14,95667
11	10,3		15,9	
12	10,9		14,38	
12	10,8	10,83333	14,5	14,62667
12	10,8		15	
13	10,02		14	
13	10,54	10,31667	13,97	14,17667
13	10,39		14,56	
14	10,03		12,9	

	Control bajo( 8,00-13,3)µg/L		Control alto( 12,9-15,1)µg/L	
DIA	xi	$\bar{x}$	xi	$\bar{x}$
14	10,02	10,38	13	13,06667
14	11,09		13,3	
15	10,65	10,65	13,93	14,44333
15	10,4		14,5	
15	10,9		14,9	

Valor diana (µg/L)	10,65		14	
Intervalo (µg/L)	8,00-13,3		12,9-15,1	
Media (µg/L)	10,28044	10,28044	14,06978	14,06978
S	0,681377	0,569781	0,615179	0,366924
CV%	5,983973	4,049677	4,842843	3,569144

La imprecisión intermedia del laboratorio,  $S_L$ :

$$S_L = \sqrt{\frac{\sum_{d=1}^D (\bar{x}_d - \bar{\bar{x}}_D)^2}{D-1} + \left(\frac{n-1}{n}\right) \cdot S_r^2}$$

Donde:

“D” es el número de días, “n” el número de replicados por día,  $\bar{x}_d$  la media de los resultados de cada día,  $\bar{\bar{x}}_D$  es la media de las medias y  $x_d$  los resultados de cada día “d”.

La desviación estándar de las medias al cuadrado ( $B^2$ ) es el primer sumando de la raíz cuadrada antes indicada:

$$B^2 = \frac{\sum_{d=1}^D (\bar{x}_d - \bar{\bar{x}}_D)^2}{D-1}$$

Y la **variabilidad intraserial** ( $S_r$ ):

$$S_r = \sqrt{\frac{\sum_{d=1}^D \sum_{i=1}^n (x_{di} - \bar{x}_d)^2}{D(n-1)}}$$

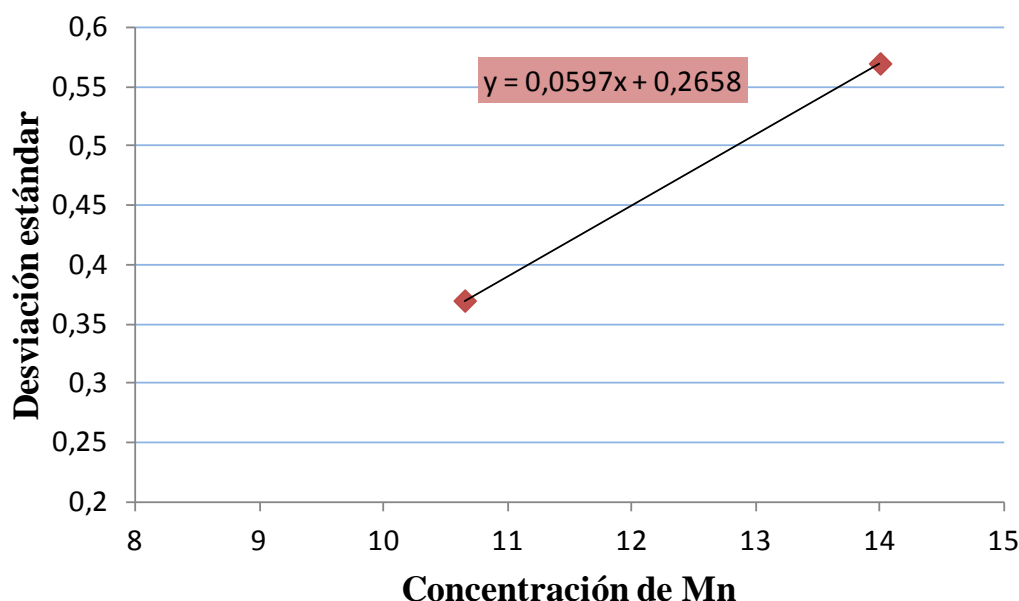
**Tabla 3-37:** Variabilidad intraserial ( $S_r$ ) e Imprecisión intermedia del laboratorio ( $S_L$ )

Parámetro	Control bajo (µg/L)	Control alto (µg/L)
Valor Diana	10,68	14
Intervalo aceptabilidad	8,00-13,3	12,9-15,1
$S_r$ (CV%)	<b>0,101</b>	<b>0,056</b>
$S_L$ (CV%)	<b>0,578</b>	<b>0,326</b>

Para la estimación de la incertidumbre o, en este caso, la reproducibilidad o componente mayoritario de la misma, cuando existe un componente de incertidumbre proporcional a la concentración y otro constante, una adecuada aproximación es la determinación de una recta de regresión simple en 2 o más niveles de concentración.

En general, la imprecisión en la determinación de los elementos traza varía según la concentración.

**Ilustración 3-11:** Estimación de la imprecisión por medio de una recta de regresión representando las desviaciones estándar correspondientes a cada concentración de sueros de referencia.



Los resultados en este rango de trabajo tienen una **imprecisión asociada de un 5,97 % + 0,3 µg/L**. Se considera aceptable una imprecisión inferior al 10 -15%, dependiendo de la concentración.

#### A. EXACTITUD

Los requisitos previos del método pueden realizarse sobre un valor mínimo de inexactitud, por ejemplo 10%, por el cual serían aceptables las inexactitudes de las 2

sangres control o comprobando que los valores aceptados del material certificado se encuentren dentro del intervalo de confianza al 95% para la media de los 15 valores obtenidos utilizando la incertidumbre combinada calculada como desviación estándar.

Así:

$$LC_{95\%} = x \pm t \frac{u}{\sqrt{N}} = x \pm 2,15 \frac{(0,0597x + 0,3)}{\sqrt{15}}$$

**Tabla 3-38:** Límite de confianza

<i>Parámetro</i>	<b>Control bajo (µg/L)</b>	<b>Control alto (µg/L)</b>
<b>Valor Diana</b>	<b>10,68</b>	<b>14</b>
<b>Intervalo aceptabilidad</b>	<b>8,00-13,3</b>	<b>12,9-15,1</b>
<b>Media</b>	<b>10,28</b>	<b>14,07</b>
<b>LC<sub>95%</sub></b>	<b>9,77 - 10,79</b>	<b>13,44 – 14,70</b>

## B. REPETIBILIDAD:

El estudio de la repetibilidad tiene menos importancia, sin embargo puede ser útil para controlar el correcto funcionamiento del equipo instrumental y de algún proceso del procedimiento analítico.

Para una estimación del mismo puede utilizarse una mezcla el propio material utilizado como control interno que tiene la ventaja de poderse reproducir fácilmente en cualquier momento y de disponer de varias concentraciones.

En este caso se analizan 20 muestras de 2 controles internos (controles de Seronorm TM Trace Elements SERUM niveles 1 y 2), el mismo día, con el mismo operador y curva de calibración, con los resultados que se indican en las siguientes tablas.

**Tabla 3-39:** Estimación de la repetibilidad en el nivel bajo del control interno

<b>Control interno bajo ( 8,00-13,3) µg/L</b>						
9,66	10,2	9,77	8,85	9,64	<b>S</b>	<b>0,72</b>
9,64	10,72	9,77	8,75	9,81	<b>media</b>	<b>9,88</b>
9,76	10,03	9,82	10,21	9,88	<b>CV (%)</b>	<b>7,27</b>
10,72	8,83	12	9,89	9,77		

**Tabla 3-40:** Estimación de la repetibilidad en el nivel alto del control interno

Control alto( 12,9-15,1) µg/L						
14,84	13,96	15,03	13,4	13,73	<b>S</b>	<b>0,74</b>
14,66	14,22	14,24	13,86	13,18	<b>media</b>	<b>13,77</b>
14,57	12,9	14,9	13,09	12,9	<b>CV (%)</b>	<b>5,37</b>
13,58	12,9	13,12	13,06	13,22		

Al igual que se observaba en el caso de la reproducibilidad, la repetibilidad depende de la concentración. Así, debemos tener en cuenta que fuera de esas concentraciones analizadas los coeficientes de variación variarán, en principio y aproximadamente, de acuerdo a la recta que delimitan los dos puntos de desviación estándar correspondientes a los controles internos 1 y 2 ( $y = 0,0051x + 0,6696$ ).

### 3.5.- VALORES DE REFERENCIA EN NEONATOS SANOS

Se mide la concentración de Mn en 124 muestras de cordón umbilical

**Tabla 3-41:** Concentración de Mn en sangre de cordón umbilical

	Mn (µg /L)	edad materna	edad gestacional	sexo	peso nacer (g)	Apgar	tipo parto
1	2,46	34	39	v	3340	8//10	fórceps
2	2,52	31	41	v	4150	10//10	eutócico
3	2,62	40	41	v	3400	10//10	cesárea
4	2,73	33	40	v	3200	9//10	fórceps
5	2,75	25	40	m	3380	9//10	eutócico
6	2,83	30	41	v	3610	9//10	cesárea
7	2,98	32	39	m	3360	9//10	fórceps
8	3,29	25	41	v	3980	10//10	cesárea
9	3,42	15	39	m	2960	9//10	eutócico
10	3,45	28	40	m	2900	8//9	cesárea
11	3,78	27	40	m	3185	10//10	eutócico
12	3,79	31	33	m	2150	3//7//10	eutócico
13	3,83	37	39	v	4180	8//10	fórceps
14	3,93	25	37	m	3300	10//10	eutócico
15	3,98	21	40	v	3760	8//9	eutócico
16	4,05	29	39	m	2450	9//10	cesárea
17	4,15	28	39	m	3320	9//10	eutócico
18	4,33	29	39	v	2890	9//10	eutócico
19	4,36	37	39	m	2930	10//10	eutócico
20	4,63	35	33	m	1810	9//10	eutócico

	Mn (µg /L)	edad materna	edad gestacional	sexo	peso nacer (g)	Apgar	tipo parto
21	4,66	29	41	v	3410	8//10	cesárea
22	4,73	31	41	v	3860	10//10	eutócico
23	4,73	29	38	m	2950	7//10	eutócico
24	4,74	21	39	m	2630	10//10	eutócico
25	4,79	23	39	m	3090	10//10	eutócico
26	4,79	37	37	v	3475	9//10	eutócico
27	4,97	37	41	m	3395	9//10	cesárea
28	4,97	34	36	m	2660	10//10	eutócico
29	4,97	37	40	v	4010	5//10	fórceps
30	4,98	37	40	v	3430	7//9	cesárea
31	5,03	38	38	v	2980	10//10	eutócico
32	5,06	35	37	m	3290	9//10	eutócico
33	5,26	26	39	m	2890	9//10	eutócico
34	5,38	28	37	v	2670	10//10	eutócico
35	5,43	25	39	m	4210	4//9	cesárea
36	5,48	27	39	m	2970	9//10	eutócico
37	5,49	30	39	v	3600	10//10	eutócico
38	5,53	28	38	v	3570	9//10	eutócico
39	5,67	16	39	v	2660	9//10	eutócico
40	5,72	33	37	m	3060	10//10	eutócico
41	5,87	35	40	m	3350	10//10	eutócico
42	5,87	32	41	v	3700	10//10	eutócico
43	5,95	24	38	v	3520	9//10	eutócico
44	6,13	39	40	m	3500	10//10	eutócico
45	6,58	40	39	m	3370	6//8//10	cesárea
46	6,61	35	41	v	2890	8//10	eutócico
47	6,67	34	40	v	3030	10//10	eutócico
48	6,72	31	40	v	4160	8//10	cesárea
49	6,75	38	39	m	2495	9//10	cesárea
50	7,07	34	41	v	3840	9//10	eutócico
51	7,1	31	40	m	3385	9//10	eutócico
52	7,27	31	40	m	2770	9//10	cesárea
53	7,27	26	40	m	3130	8//10	eutócico
54	7,28	35	30	v	1394	4//8//9	cesárea
55	7,36	29	39	v	3410	9//10	eutócico
56	7,38	32	40	m	3140	9//10	eutócico
57	7,45	32	41	v	4275	10//10	eutócico
58	7,48	35	40	v	2980	9//10	eutócico
59	7,68	34	36	m	2410	8//10	cesárea



	Mn (µg /L)	edad materna	edad gestacional	sexo	peso nacer (g)	Apgar	tipo parto
60	7,72	30	41	m	3780	9//10	eutócico
61	7,76	32	38	v	2830	9//10	eutócico
62	7,87	32	41	v	3700	10//10	eutócico
63	7,88	31	41	m	3150	9//10	eutócico
64	7,9	26	39	m	3870	9//10	eutócico
65	8,23	35	39	m	4040	10//10	eutócico
66	8,27	36	41	v	4300	9//10	cesárea
67	8,48	35	41	v	3525	8//10	eutócico
68	8,48	32	41	m	3620	8//10	eutócico
69	8,59	24	39	v	3350	9//10	eutócico
70	9,09	30	40	m	3640	9//10	eutócico
71	9,21	31	41	m	3740	9//10	cesárea
72	9,37	32	40	v	3350	9//10	eutócico
73	9,53	41	41	m	3830	6//10	fórceps
74	9,64	26	38	v	3150	10//10	eutócico
75	9,99	24	38	m	3350	9//10	eutócico
76	10,29	38	34	v	2245	8//9	eutócico
77	10,44	30	41	v	3530	9//10	cesárea
78	10,48	27	40	m	3675	9//10	eutócico
79	10,52	37	36	m	2620	9//10	eutócico
80	10,6	31	39	m	3580	10//10	eutócico
81	10,66	19	38	m	3420	9//10	eutócico
82	10,78	23	37	m	2480	9//10	eutócico
83	11,25	20	37	m	3470	8//10	eutócico
84	11,29	30	38	v	3640	7//10	cesárea
85	11,33	29	37	m	2480	10//10	cesárea
86	11,48	36	41	v	3160	5//8//9	eutócico
87	11,5	29	40	m	2700	10//10	cesárea
88	11,72	40	37	v	2380	9//10	cesárea
89	12,12	30	40	v	3380	9//10	eutócico
90	12,52	39	37	m	2660	9//10	eutócico
91	12,78	27	39	m	3710	9//10	eutócico
92	12,78	21	39	v	2840	8//9	fórceps
93	13	33	40	v	3225	10//10	eutócico
94	13,41	33	33	v	1860	8//9	eutócico
95	13,68	27	40	v	3090	9//10	eutócico
96	14,11	28	41	v	3530	10//10	fórceps
97	14,52	36	36	m	2160	9//10	eutócico
98	14,79	24	39	v	3660	9//10	eutócico

	Mn (µg /L)	edad materna	edad gestacional	sexo	peso nacer (g)	Apgar	tipo parto
99	15,07	27	40	v	3935	9//10	eutócico
100	15,69	35	40	m	3590	10//10	eutócico
101	15,7	27	40	v	3020	9//10	cesárea
102	16,26	27	41	m	2880	6//10	eutócico
103	16,62	33	41	m	3220	9//10	eutócico
104	18,02	24	40	v	3360	9//10	cesárea
105	18,19	18	39	m	3030	10//10	eutócico
106	18,6	29	40	m	2780	9//10	eutócico
107	18,6	34	38	v	3310	10//10	eutócico
108	19,48	31	40	m	3265	9//10	cesárea
109	20,28	32	39	m	3410	9//10	cesárea
110	20,39	40	37	v	2380	9//10	cesárea
111	20,91	31	39	m	2730	9//10	eutócico
112	21,12	30	39	m	3030	9//10	eutócico
113	21,62	28	37	m	2340	9//10	eutócico
114	24,22	24	40	m	4000	10//10	eutócico
115	27,39	28	37	m	2650	8//10	cesárea
116	31,04	39	39	v	2860	9//10	eutócico
117	31,27	27	40	v	3800	10//10	eutócico
118	32,5	31	41	v	3980	9//10	eutócico
119	34,15	29	38	m	3130	9//10	eutócico
120	36,47	30	41	v	3610	9//10	cesárea
121	48,44	37	41	v	3820	9//10	eutócico
122	54,93	30	41	v	3380	10//10	eutócico
123	59,8	31	40	v	3520	9//10	fórceps
124	70,57	32	36	m	3180	9//10	eutócico

Se realiza la prueba de **Kolmogorov-Smirnov** para comprobar si la concentración de Mn en sangre de cordón sigue una distribución gaussiana.

**Tabla 3-42:** Prueba de Kolmogorov-Smirnov para las concentraciones de Mn en sangre de cordón.

Mn cordón		
N		124
Parámetros normales(a,b)	Media	11,9121
	Desviación típica	11,43745
Diferencias más extremas	Absoluta	0,204
	Positiva	0,199
	Negativa	-0,204
Z de Kolmogorov-Smirnov		2,210
Sig. asintót. (bilateral)		0,000

La probabilidad  $p$  es igual a 0,000 ( $< 0,05$ ) por lo que la diferencia con la distribución normal es estadísticamente significativa, por lo que los datos NO siguen una distribución normal, la distribución NO ES GAUSSIANA.

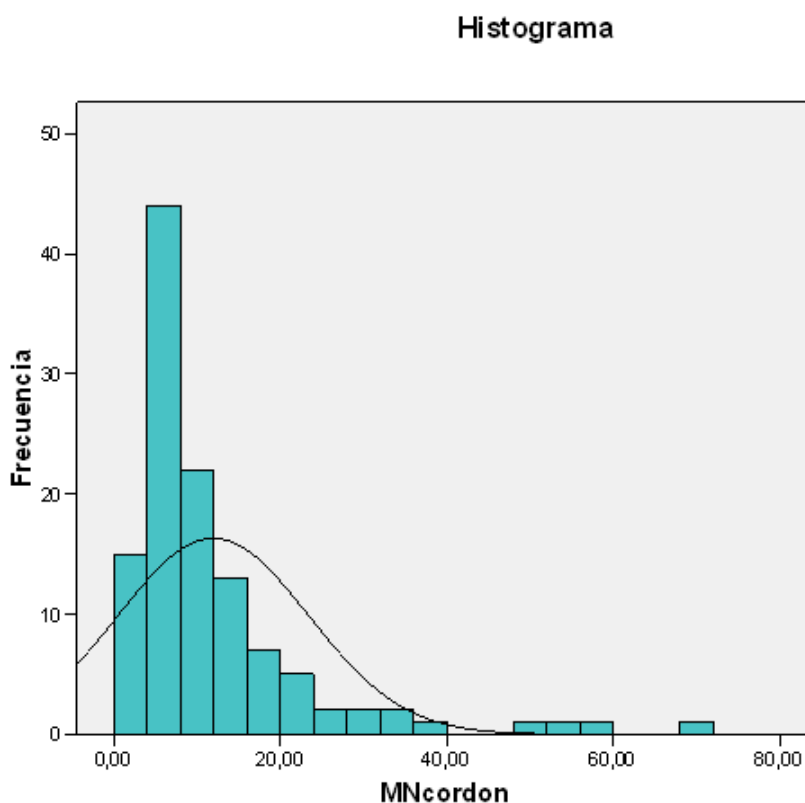
**Tabla 3-43:** Estadísticos descriptivos de la concentración de Mn en sangre de cordón

	N	Mínimo	Máximo	Media
Mn cordón	124	2,46	70,57	11,9121

**Tabla 3-44:** Coeficientes de asimetría y curtosis, que indican cómo se aleja la curva de las concentraciones de Mn en sangre de cordón de la campana de Gauss

Desviación Típica	Asimetría		Curtosis	
Estadístico	Estadístico	Error típico	Estadístico	Error típico
11,43745	2,809	0,224	9,466	0,444

**Ilustración 3-12:** Curva de la concentración de Mn en sangre de cordón

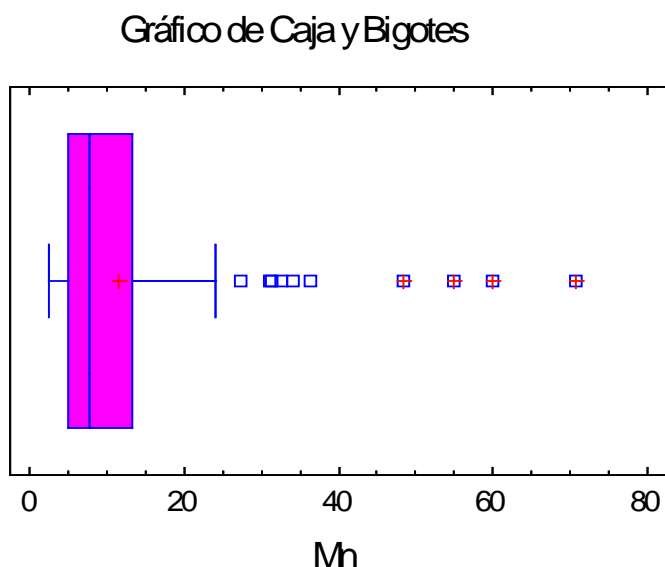


**Tabla 3-45:** Percentiles de la distribución original de Mn en sangre de cordón

Percentiles	2,5	2,6150
	97,5	55,1735

A continuación se identificarán los potenciales valores atípicos de la concentración de Mn en nuestra población de neonatos.

**Ilustración 3-13:** gráfico de valores atípicos para la concentración de Mn en neonatos.



**Tabla 3-46:** Estimación calculada de las distintas medias para ser resistentes a los valores atípicos.

Estimación de la localización	Valor ( $\mu\text{g/l}$ )
Media de la muestra	11,6463
Mediana de la muestra	7,875
Media truncada	8,943
Media winsorizada	9,704

**Tabla 3-47:** Estimación de la escala en estudio de valores atípicos en la concentración de Mn en neonatos.

Estimación de la escala	Valor ( $\mu\text{g/l}$ )
Desv. Típica de la muestra	11,1652
MAD/0,6745	4,788
Sbi	5,385
Sigma winsorizada	6,043

El winsorizado correspondiente se estima reemplazando el 15% de los valores superiores e inferiores de la muestra por valores del interior de la muestra. Se observa que el impacto en el **intervalo de confianza del 95% para la media es importante:**

- Intervalo de confianza 95% media **estándar:** 9,661 - 13,631
- Intervalo de confianza 95% media **winsorizada:** 8,4283 - 10,985

Si se muestran los valores mayores y menores de la concentración de Mn en nuestra población de neonatos se obtiene la tabla siguiente:

**Tabla 3-48:** Valores mayores y menores de la concentración de Mn en la población de neonatos

Valor (µg/l)	Valores estudentizados		Modificados
	Sin supresión	Con supresión	MAD puntuación z
<b>2,46</b>	-0,8228	-0,828	-1,124
<b>2,52</b>	-0,817	-0,823	-1,112
<b>2,62</b>	-0,806	-0,814	-1,091
<b>2,73</b>	-0,798	-0,804	-1,068
<b>2,75</b>	-0,797	-0,802	-1,64
...	...	...	...
<b>36,47</b>	2,222	2,267	5,933
<b>48,44</b>	3,290	3,451	8,417
<b>54,93</b>	3,870	4,128	9,764
<b>59,8</b>	4,314	4,683	10,775
<b>70,57</b>	<b>5,275</b>	6,031	13,010

Los **valores estudentizados** miden cuántas desviaciones típicas de cada valor proceden de la media de la muestra (11,646 µg/L).

El **valor más extremo** es el de la muestra de cordón que dio como resultado una concentración de manganeso de **70,57 µg/L**, que es **5,277 desviaciones típicas de la media**.

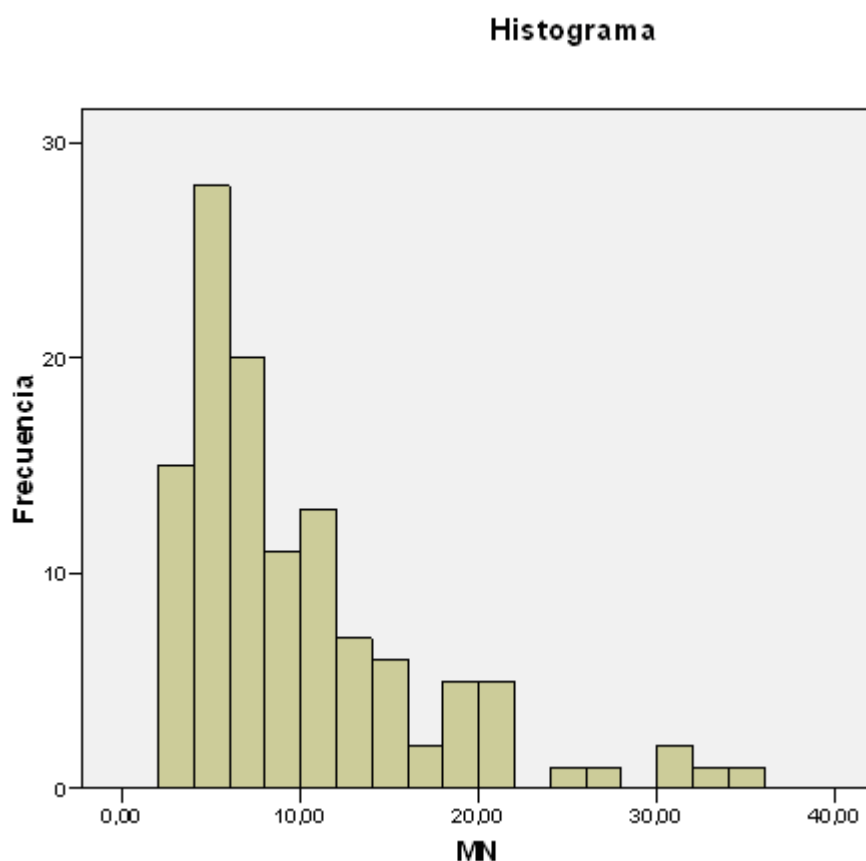
Encontramos resultados similares al calcular las estadísticas de la muestra después de suprimir cada punto uno por uno, y cuando la media y la desviación típica están basadas en la desviación absoluta de la mediana (MAD) con valores de los resultados modificados superiores a 3,5 en valor absoluto, de los cuales hay 5 que pueden ser fácilmente **valores atípicos: 36,47; 48,44; 54,93; 59,8 y 70,57 µg/L de Mn**.

Una vez eliminados los 5 valores atípicos encontrados, se analiza de nuevo la distribución de la concentración de Mn en neonatos, obteniéndose los valores estadísticos siguientes:

**Tabla 3-49:** Estadísticos descriptivos de la concentración de Mn en sangre de cordón eliminando los valores atípicos.

<b>N</b>		<b>119</b>
<b>Media</b>		<b>9,8852</b>
<b>Desviación típica</b>		<b>6,741</b>
Mediana		7,7400
Asimetría		1,612
Error típ. de asimetría		0,223
Curtosis		2,646
Error típ. de curtosis		0,442
<b>Percentiles</b>	<b>2,5</b>	<b>2,6175</b>
	25	4,9775
	50	7,7400
	75	12,5850
	<b>97,5</b>	<b>31,3008</b>

**Ilustración 3-14:** Histograma de la concentración de Mn en sangre de cordón eliminando valores atípicos.



La distribución obtenida presenta una curtosis y una asimetría que la alejan de la distribución gaussiana.

**Los límites del intervalo de referencia** (que incluye al 95% central de la distribución) son:

- **P2, 5 = 2,62  $\mu\text{g/L}$**
- **P97, 5 = 31,30  $\mu\text{g/L}$**

El intervalo de confianza al 90% de estos límites será:

- **El límite inferior del intervalo de referencia** de la concentración de manganeso en sangre de cordón estará incluido entre **2,46 y 2,98  $\mu\text{g/L}$** , (posiciones 1 y 7 de las muestras analizadas).
- **El límite superior del intervalo de referencia** de la concentración de manganeso en sangre de cordón estará incluido entre **24,22 y 34,15  $\mu\text{g/L}$**  (posiciones 113 y 119 de las muestras analizadas).

Consultando la bibliografía usamos como Límite Superior de la Normalidad (LSN) para la población neonata 11,39  $\mu\text{g/L}$ .

Con este dato, se analizará que porcentaje de nuestra población de neonatos de referencia tiene una concentración de Mn superior al LSN citado en la bibliografía.

**Tabla 3-50:** *Porcentaje de nuestra población de neonatos que tienen una concentración de Mn superior al LSN*

Percentiles	Válidos	119
	69	11,2820
	70	11,3300
	71	11,4840

El 71% de las muestras de cordón estudiadas presentan una concentración inferior a 11,48  $\mu\text{g/L}$ . Por lo que el 29 % de nuestra población de neonatos tiene valores superiores al LSN hallado en la bibliografía (11,39  $\mu\text{g/L}$ ).

### 3.6.- EFECTO DE LOS CRITERIOS DE PARTICIÓN

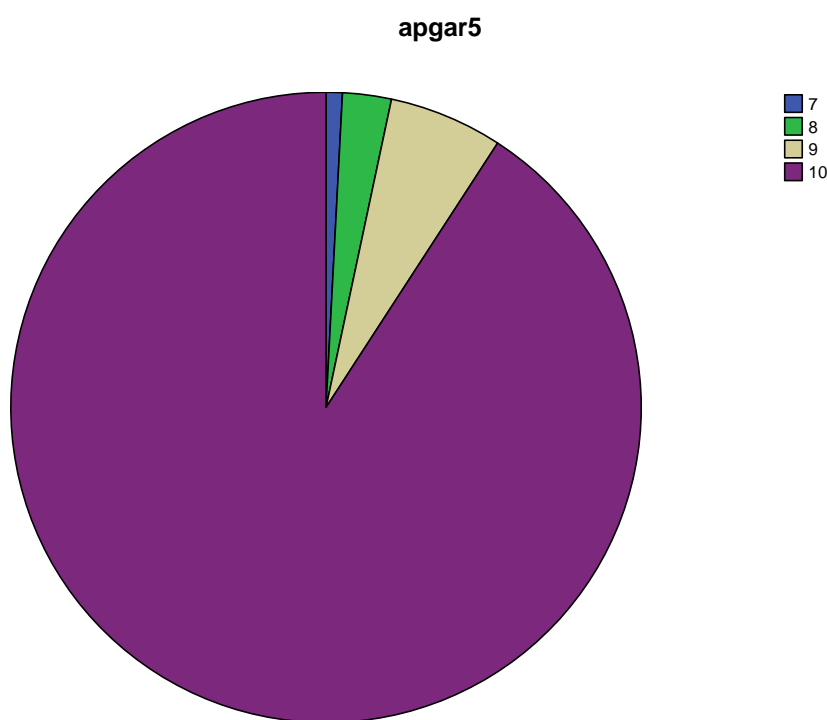
A continuación se analizará la influencia de las distintas variables dependientes estudiadas (Apgar, tipo de parto, sexo, peso al nacer, edad gestacional, edad materna y bilirrubina) sobre la concentración de Mn en neonatos de nuestra distribución de referencia.

a) Distribución según el Apgar a los cinco minutos

**Tabla 3-51:** Distribución de la concentración de Mn en neonatos según el Apgar a los 5 minutos

Apgar	Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
7	1	0,8	0,8	0,8
8	3	2,5	2,5	3,3
9	7	5,8	5,8	9,2
10	108	90,8	90,8	100,0
Total	119	100,0	100,0	

**Ilustración 3-15:** Distribución de la concentración de Mn en neonatos según el Apgar a los 5 minutos



El 90,8 % de los niños tenían un Apgar a los 5 minutos de 10.

Los puntos en el test de Apgar al nacer no demuestran efecto en nuestra muestra sobre la concentración de Mn en sangre de cordón, el valor del estadístico  $\chi^2$  para el test de Kruskal – Wallis es de 2,609 para 3 grados de libertad (puntuación del Apgar de 7,8,9,10) con una significación de  $p=0,456$ .

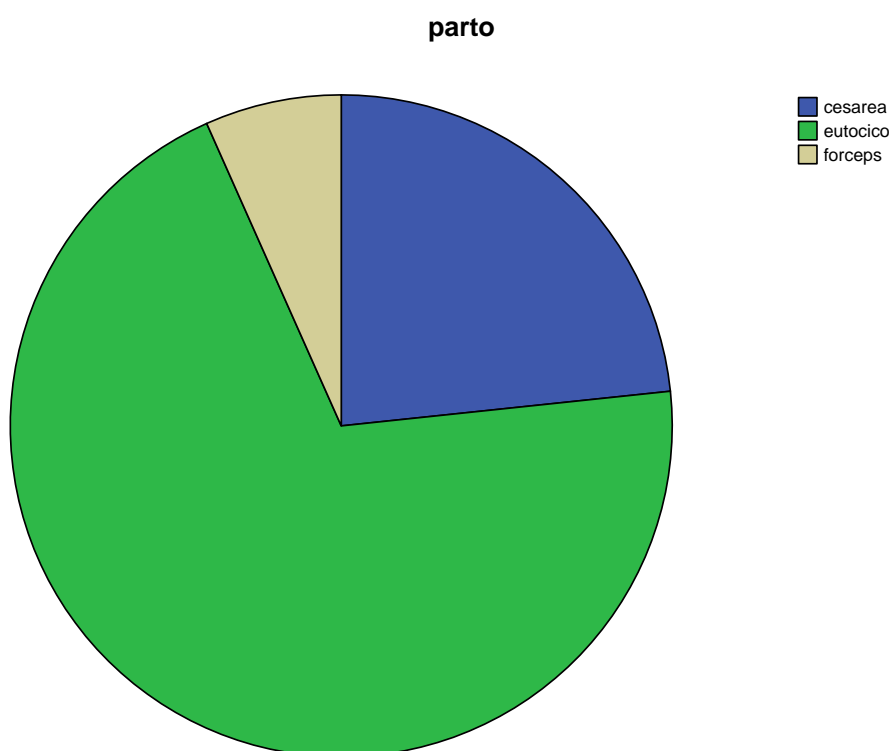


b) Distribución en función del tipo de parto.

*Tabla 3-52: Distribución de la concentración de Mn en neonatos según el tipo de parto*

Tipo parto	Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
cesárea	28	23,3	23,3	23,3
eutócico	83	70,0	70,0	93,3
fórceps	8	6,7	6,7	100,0
<b>Total</b>	119	100,0	100,0	

*Ilustración 3-16: Distribución de la concentración de Mn en neonatos según el tipo de parto*



El 70% de los partos fue eutócico.

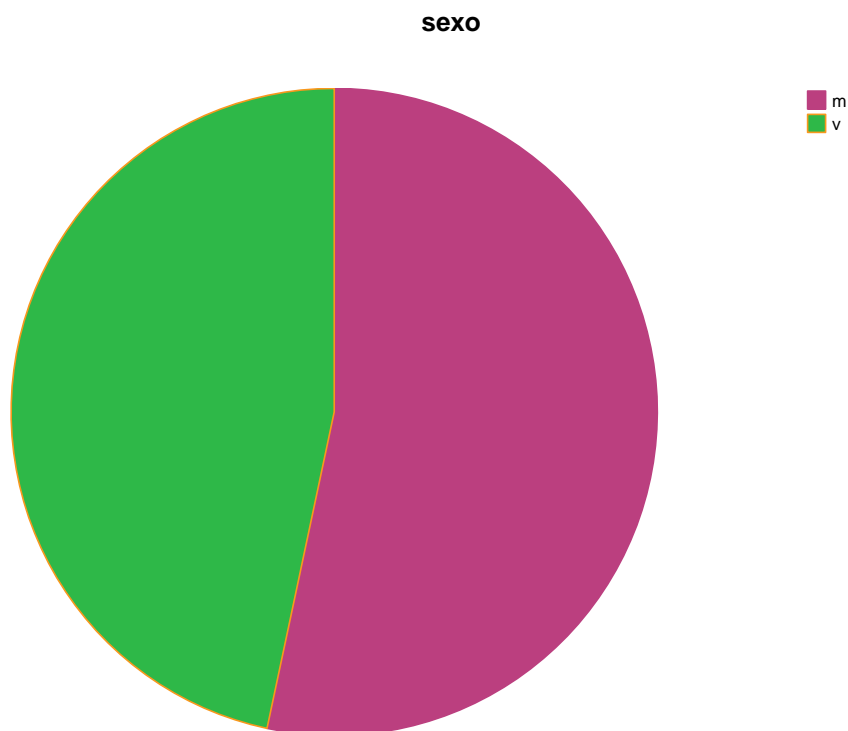
El tipo de parto no tiene efecto estadístico sobre la concentración de Mn en cordón, el valor del estadístico  $\chi^2$  para el test de Kruskal – Wallis es de 1,58 para 2 grados de libertad con una significación de  $p=0,454$ .

c) Distribución según el sexo.

**Tabla 3-53:** Distribución de la concentración de Mn en neonatos según el sexo.

Sexo	Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
mujer	63	53,3	53,3	53,3
varón	56	46,7	46,7	100,0
Total	119	100,0	100,0	

**Ilustración 3-17:** Distribución de la concentración de Mn en neonatos según el sexo



El 53,3% de los nacidos fueron mujeres, el 46,7% varones.

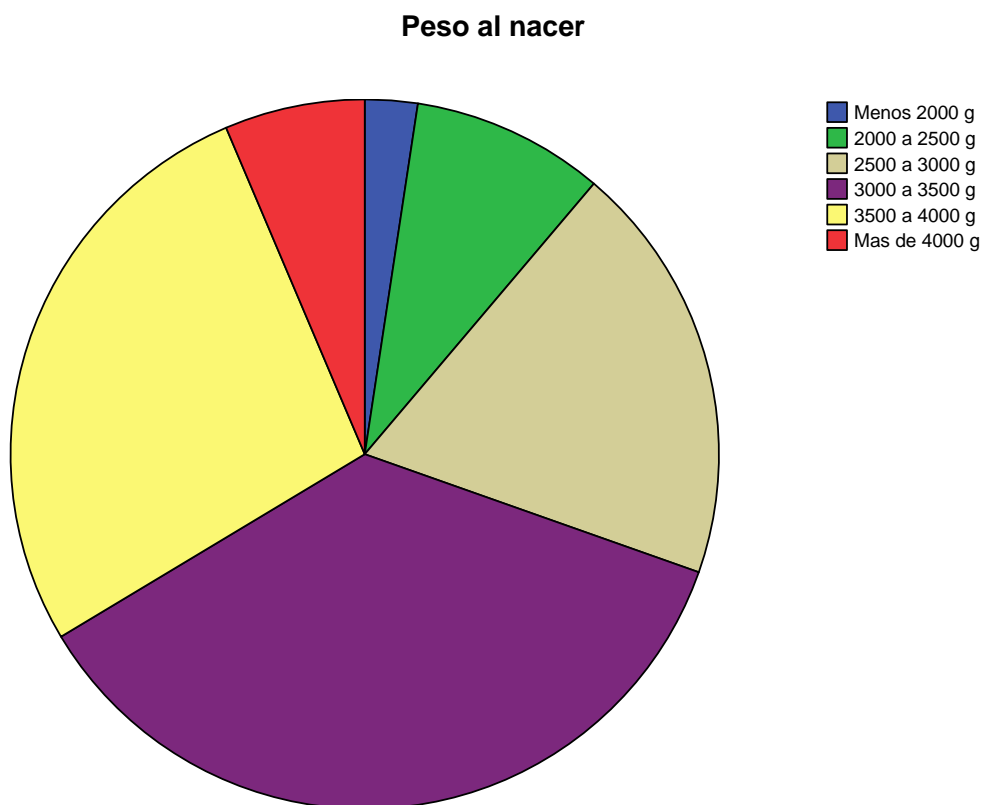
Si comparamos la concentración de Mn en las muestras de los niños comparadas con las niñas, usando el test de Kruskal-Wallis asumiendo que la distribución es no-paramétrica hallamos que no existen diferencias significativas entre los dos grupos. El valor del estadístico  $\chi^2$  para el test es 0,147 y la significación es  $p=0,701$ .

d) Peso al nacer

**Tabla 3-54:** Distribución de la concentración de Mn en neonatos según el peso al nacer

Peso al nacer	Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
Menos 2000 g	2	2,4	2,4	2,4
2000 a 2500 g	10	8,8	8,8	11,2
2500 a 3000 g	23	19,2	19,2	30,4
3000 a 3500 g	44	36,0	36,0	66,4
3500 a 4000 g	33	27,2	27,2	93,6
Más de 4000 g	7	6,4	6,4	100,0
Total	119	100,0	100,0	

**Ilustración 3-18:** Distribución de la concentración de Mn en neonatos según el peso al nacer



Respecto al peso al nacer tampoco aparecen diferencias estadísticamente significativas comparando los distintos pesos, en el test de Kruskal – Wallis obtenemos una  $\chi^2$  de 7,438, con 5 grados de libertad, una significación  $p = 0,190$ .

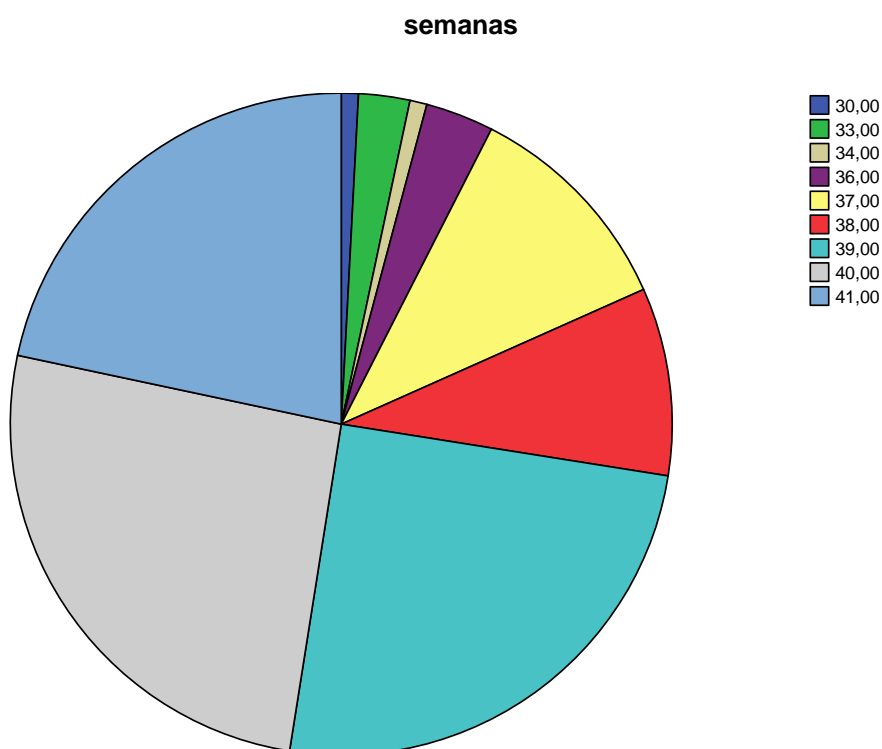
Si considero el peso como variable cuantitativa continua tampoco hay correlación, se obtiene un coeficiente de correlación de Pearson 0,025, no significativo.

e) Distribución de los partos según la edad gestacional al nacer

**Tabla 3-55:** Distribución de la concentración de Mn en neonatos según la edad gestacional al nacer

	Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
30	1	0,8	0,8	0,8
33	3	2,5	2,5	3,3
34	1	0,8	0,8	4,2
36	4	3,3	3,3	7,5
37	13	10,8	10,8	18,3
38	11	9,2	9,2	27,5
39	29	25,0	25,0	52,5
40	31	25,8	25,8	78,3
41	26	21,7	21,7	100,0
Total	119	100,0	100,0	

**Ilustración 3-19:** Distribución de la concentración de Mn en neonatos según la edad gestacional al nacer



Los partos incluidos en el estudio agrupan prematuros (menos de 37 semanas de gestación) que suponen el 7,5% de los casos, el resto (92,5%) nacieron a término.

Respecto a la edad gestacional tampoco aparecen diferencias estadísticamente significativas comparando las distintas semanas de madurez con el test de Kruskal – Wallis obtenemos una  $\chi^2$  de 4,853, con 8 grados de libertad, una significación  $p= 0,773$ .

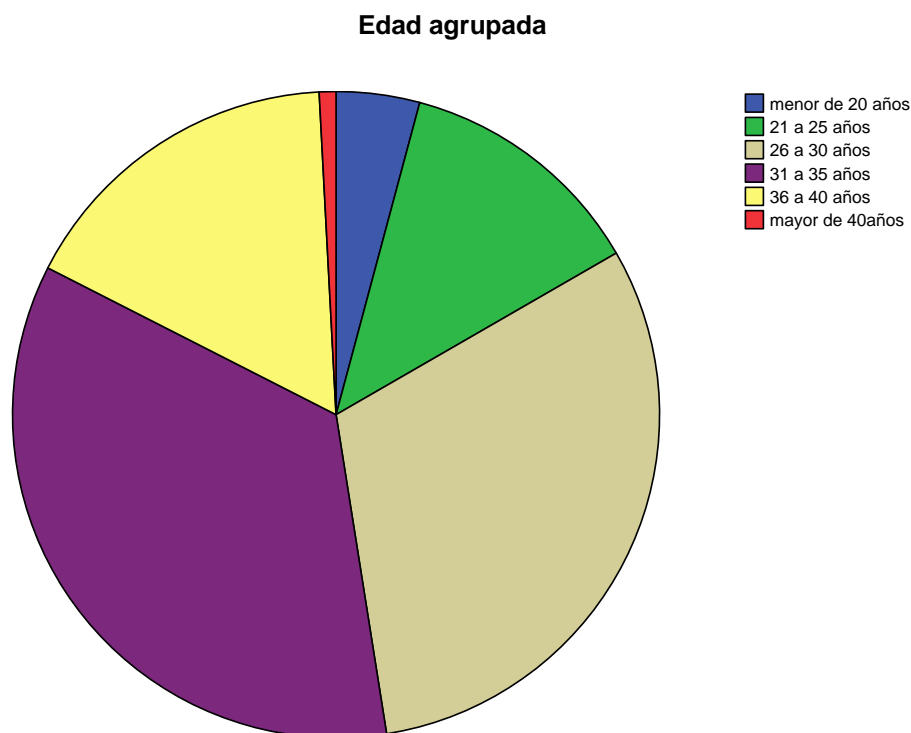
La prematuridad o no (menor de 36 semanas de gestación) tampoco muestra efecto sobre la concentración de Mn en el cordón. El estadístico U de Mann – Whitney presenta un valor de 477, con una significación  $p= 0,823$ .

#### f) Distribución según la edad agrupada de la madre

**Tabla 3-56:** Distribución de la concentración de Mn en neonatos según la edad agrupada de la madre

	Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
menor de 20 años	5	4,2	4,2	4,2
21 a 25 años	15	12,5	12,5	16,7
26 a 30 años	37	30,8	30,8	47,5
31 a 35 años	41	35,0	35,0	82,5
36 a 40 años	20	16,7	16,7	99,2
mayor de 40años	1	0,8	0,8	100,0
Total	119	100,0	100,0	

**Ilustración 3-20:** Distribución de la concentración de Mn en neonatos según la edad agrupada de la madre



El 4,2 % son menores de 20 años y un 17,5% son mayores de 35 años.

La edad en años de la madre al nacer el niño, agrupada en 6 valores de 5 en 5 años desde menor de 20 años, hasta mayor de 40, tampoco tiene efecto estadísticamente significativo en la concentración de Mn en cordón.  $\chi^2$  para el test de Kruskal – Wallis es de 2,117, para 5 grados de libertad, con una significación de  $p=0,833$ .

#### g) Bilirrubina

Considerando que todos los neonatos que no tienen determinada la concentración de bilirrubina sérica se debe a que no hay sospecha clínica de que esté elevada y por tanto su valor es normal, al comparar los dos grupos tenemos:

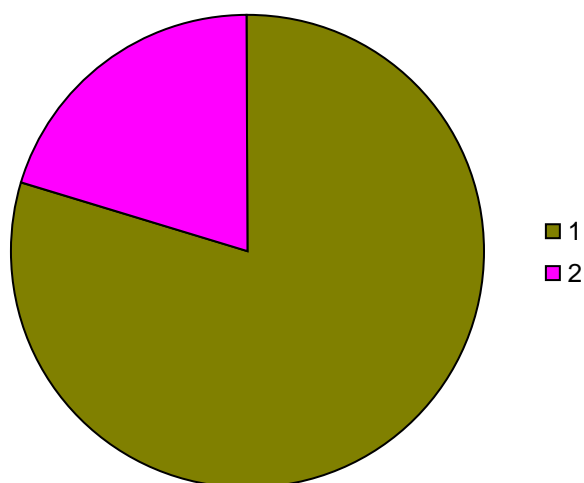
- 95 neonatos con bilirrubina normal para la edad
- 24 con concentraciones patológicas

La mediana de la concentración de Mn en los patológicos es 10,94  $\mu\text{g/L}$  y la mediana de los normales 7,43  $\mu\text{g/L}$ .

**Tabla 3-57:** Distribución de la concentración de Mn en neonatos según la bilirrubina

Bilirrubina	N	Rango promedio	Suma de Rangos
Normal	95	59,28	5809,00
Elevada	24	74,65	1941,00
Total	119		

**Ilustración 3-21:** Distribución de la concentración de Mn en neonatos según la bilirrubina



Al estudiar sus diferencias con la prueba de la U de Mann – Whitney por ser distribuciones no paramétricas de una variable cuantitativa continua , se observa que las diferencias no llegan a ser significativas aunque casi alcanzan la significación ( $p= 0,052$ ).

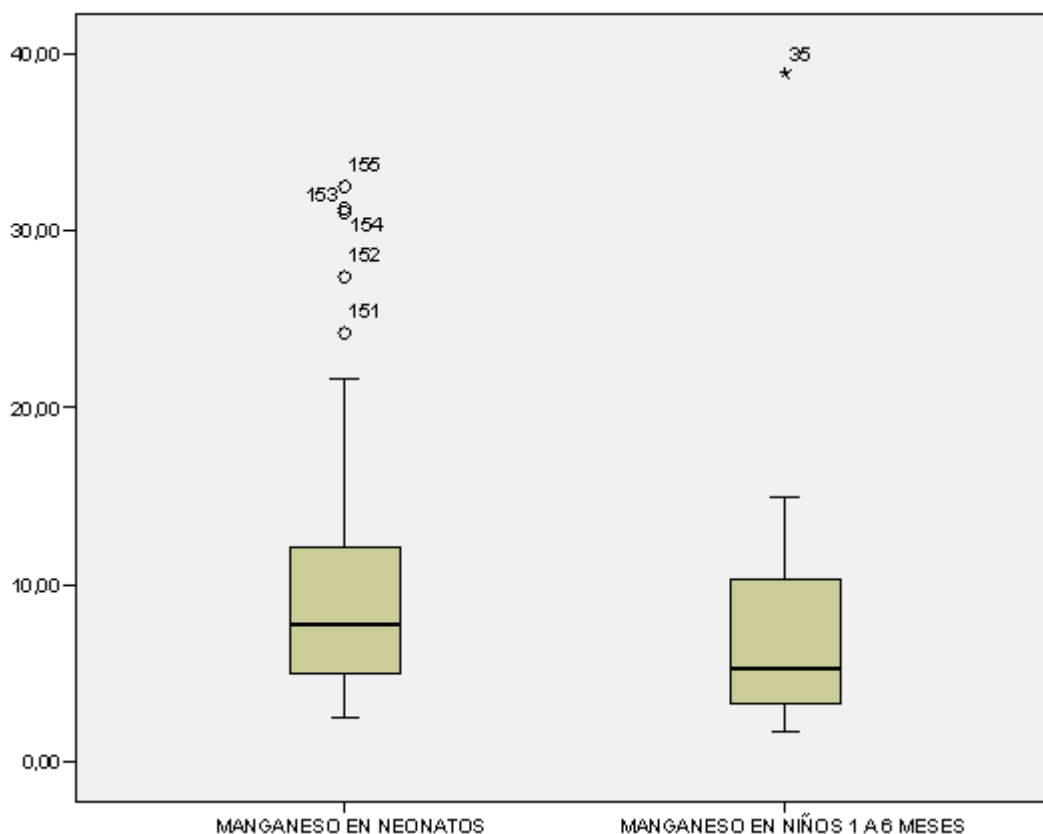
### 3.7.- SANGRE DE CORDÓN vs NIÑOS DE 1 A 6 MESES

Se realizó la prueba no paramétrica U de Mann – Whitney para comparar la mediana de la concentración de Mn en sangre de cordón ( $7,7 \mu\text{g/L}$ ) con la mediana de la concentración de Mn en sangre de niños de 1 a 6 meses ( $5,27 \mu\text{g/L}$ ) observándose diferencias estadísticamente significativas,  $p= 0,018 (<0,05)$ .

**Tabla 3-58:** Medianas de la concentración de Mn en neonatos y en niños de 1 a 6 meses

	PERCENTIL 50
Mn en neonatos	7,7000
Mn en niños de 1 a 6 meses	5,2700

**Ilustración 3-22:** Concentración de Mn en sangre de cordón vs concentración de Mn en niños de 1 a 6 meses.



### 3.8.- Mn EN LACTANTES EN FUNCIÓN DEL SEXO

*Tabla 3-59: Concentración de Mn en niños de 1 a 6 meses*

	edad ( días)	sexo	Mn	Tipo leche
1	7	M	6,17	A
2	67	H	3,57	M
3	45	M	2,28	A
4	85	H	2,42	A
5	1	H	4,59	M
6	35	H	5,29	M
7	113	M	8,78	M
8	1	M	7,68	A
9	130	M	10,33	M
10	24	H	14,95	M
11	57	H	10,94	A
12	129	H	4,13	M
13	24	H	11,61	M
14	7	H	3,2	M
15	1	M	13,7	A
16	4	H	3,48	M
17	78	H	17,49	M
18	33	H	4,67	M
19	1	H	1,74	M
20	118	M	1,92	M
21	35	M	5,27	A
22	76	H	3,24	M
23	29	H	38,94	A
24	21	M	2,87	M
25	122	M	10,93	A



**Tabla 3-60:** Rango promedio en niños de 1 a 6 meses respecto al sexo.

Sexo	N	Rango promedio	Suma de rangos
Hombre	15	10,85	141,00
Mujer	10	12,44	112,00
Total	25		

De los 25 lactantes de 1 a 6 meses estudiados, el 40% son mujeres.

Se realizó la prueba no paramétrica U de Mann – Whitney para compara las medianas de los niños de 1 a 6 meses respecto a las niñas, observándose que no existen diferencias estadísticamente significativas,  $p= 0,570 (<0,05)$  entre ellos.

### 3.9.- NEONATOS vs LACTANTES (leche materna)

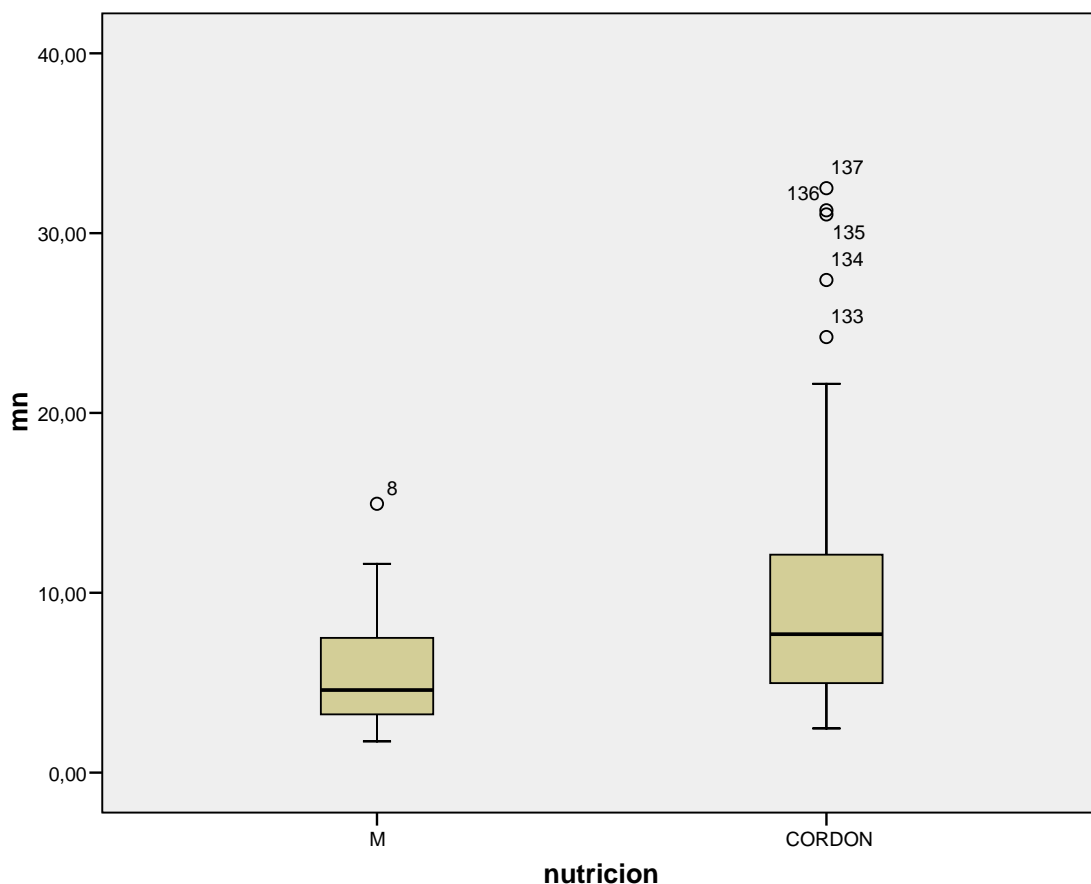
Se compara la concentración de Mn en neonatos con los lactantes alimentados con leche materna

**Tabla 3-61:** Medianas de la concentración de Mn en neonatos y lactantes con distinto tipo de nutrición

Tipo de nutrición	Mediana
NPT	7,290
Lactancia artificial	9,305
Lactancia materna	4,590
Cordón	7,700

Se realizó la prueba no paramétrica U de Mann – Whitney para compara las medianas de la concentración de Mn de los lactantes de de 1 a 6 meses alimentados con leche materna (4,59  $\mu\text{g/L}$ ) respecto neonatos (7,70 $\mu\text{g/L}$ ), observándose diferencias estadísticamente significativas,  $p= 0,003 (<0,05)$  entre ellos.

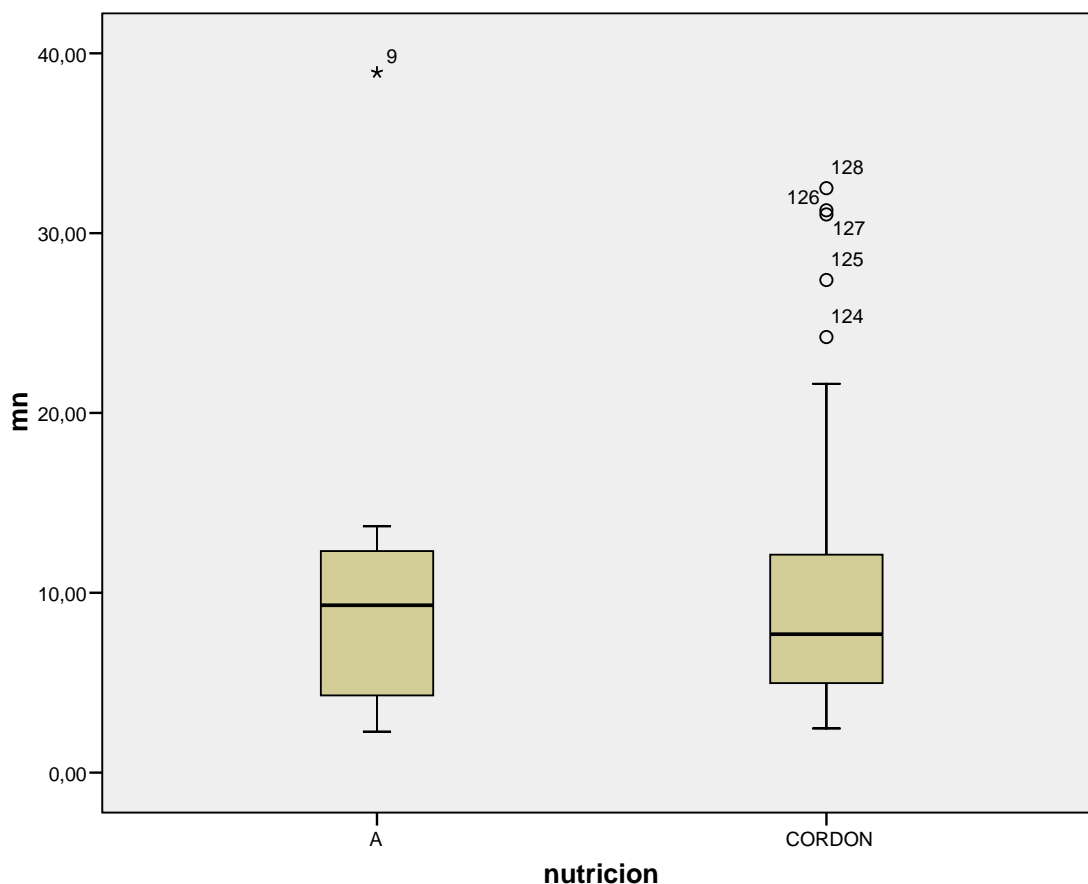
**Ilustración 3-23:** Concentración de Mn en sangre de cordón vs niños de 1 a 6 meses con lactancia materna.



### 3.10.- NEONATOS vs LACTANTES (leche artificial)

Se realizó la prueba no paramétrica U de Mann – Whitney para compara las medianas de la concentración de Mn de los lactantes de de 1 a 6 meses alimentados con leche artificial (9,3µg/L) respecto a neonatos (7,70µg/L), observándose que NO existen diferencias estadísticamente significativa,  $p= 0,128 (>0,05)$  entre ellos.

**Ilustración 3-24:** Concentración de Mn en sangre de cordón vs niños de 1 a 6 meses con lactancia artificial.



### 3.11.- LACTANTES (leche materna vs artificial)

**Tabla 3-62:** Rangos promedio de la concentración de Mn en sangre para niños alimentados con leche materna y artificial.

Nutrición	Rango promedio	Suma de rangos
Artificial	16,00	128,00
Materna	11,59	197,00

**Tabla 3-63:** Prueba U de Mann-Whitney para comparación de la concentración de Mn en niños alimentados con leche materna y leche artificial

	Mn
U de Mann-Whitney	44,000
W de Wilcoxon	197,000
Z	-1,398
Sig. asintót. (bilateral)	0,162
Sig. exacta [2*(Sig. unilateral)]	0,175

Se realizó la prueba no paramétrica U de Mann – Whitney para compara las medianas de la concentración de Mn de los lactantes de de 1 a 6 meses alimentados con leche artificial (9,305µg/L) respecto a los alimentados con leche materna (4,590 µg/L), observándose que NO existen diferencias estadísticamente significativas,  $p=0,175 (>0,05)$  entre ellos.

### 3.12.- LACTANTES ALIMENTADOS CON NPT vs NEONATOS

**Tabla 3-64:** Concentración de Mn, sexo, edad, días con NPT y diagnóstico en niños que reciben NPT.

SEXO	EDAD DIAS	DÍAS NPT	Mn (µg/L)	DIAGNÓSTICO
H	36	24	14,48	Peso 700 Sepsis Hipotensión Trombopenia Ictericia Foramen oval permeable Insuficiencia tricuspídea Anemia Dilatación pielocalicial
H	59	11	16,36	Recién nacida pretérmino de peso adecuado para edad gestacional Enfermedad membrana hialina Pausas apnea Insuficiencia tricuspídea Conjuntivitis aguda bacteriana Intolerancia digestiva transitoria Anemia multifactorial
M	44	10	7,29	Recién nacida pretérmino de peso adecuado para edad gestacional Gemelar dicigótico (1° gemelo) Riesgo infeccioso por prematuridad y distrés Enfermedad de membrana hialina Pausas de apnea Hiponatremia transitoria Ictericia ni isoimmune Muguet oral Anemia de la prematuridad Comunicación interauricular pequeña Hemorragia subependimaria izquierda grado

SEXO	EDAD	DÍAS	Mn (µg/L)	DIAGNÓSTICO
H	45	16	4,08	<p>Recién nacida pretérmino de peso adecuado para edad gestacional</p> <p>Distrés respiratorio tipo II</p> <p>Pausa de apnea</p> <p>Ductos arterioso persistente</p> <p>Reacción leucemoide</p> <p>Sepsis clínica con afectación meníngea sin confirmación bacteriológica</p> <p>Sospecha de Sepsis nosocomial</p> <p>Anemia multifactorial</p> <p>Ictericia de la prematuridad</p>
H	57	9	5	<p>Recién nacido pretérmino de peso adecuado para edad gestacional</p> <p>Síndrome de distrés respiratorio tipo II</p> <p>Pausa de apnea</p> <p>Riesgo infeccioso de prematuridad y distrés respiratorio</p> <p>Conjuntivitis aguda por Escherichia Coli</p> <p>Ictericia no isoimmune</p> <p>Anemia de la prematuridad</p> <p>Comunicación interauricular tipo os</p> <p>Dilatación pielocalicial derecha</p>
M	38	27	3,27	<p>Recién nacido pretérmino de peso adecuado para edad gestacional</p> <p>Síndrome de distrés respiratorio tipo II</p> <p>Riesgo infeccioso por prematuridad</p> <p>Pausas de apnea</p> <p>Ictericia del prematuro</p> <p>Ductus arterioso persistente</p> <p>Mala coordinación succión deglución.</p>
H	43	2	6,4	<p>Recién nacido pretérmino de peso adecuado para edad gestacional</p> <p>Enfermedad de membrana hialina</p> <p>Pausas de apnea</p> <p>Ductus arterioso persistente. Cia</p> <p>Ictericia no isoimmune</p> <p>Sospecha de Sepsis nosocomial</p>
H	8	9	17,54	<p>Recién nacido pretérmino de peso elevado para edad gestacional</p> <p>Gemelar monocorial biamniótico (2° gemelo)</p> <p>Riesgo infeccioso por prematuridad y sospecha de corioamnionitis</p> <p>Enfermedad de membrana hialina</p> <p>Ictericia no isoimmune</p> <p>Mala coordinación succión- deglución</p> <p>Anemia de la prematuridad</p> <p>Foramen oval permeable</p>

SEXO	EDAD	DÍAS	Mn (µg/L)	DIAGNÓSTICO
H	8	11	24,54	Recién nacido pretérmino de peso adecuado para la edad gestacional 1° gemelo distrés respiratorio inmediato Pausas de apnea Colonización precoz de Klebsiella Pneumoniae Conjuntivitis aguda Comunicación interauricular

**Tabla 3-65:** Rangos promedio de la concentración de Mn en sangre para niños alimentados con NPT vs neonatos.

		N	Rango promedio	Suma de rangos
<b>Mn</b>	NPT	9	67,89	611,00
	Mn sangre cordón	119	63,70	7517,00
	Total	128		

**Ilustración 3-25:** Prueba U de Mann-Whitney para comparación de la concentración de Mn en cordón vs niños de 1 a 6 meses que reciben NPT

	Mn
U de Mann- Whitney	496,00
W de Wilconxon	7517,00
Z	-0,329
Sig, Asintót. (bilateral)	0,742

Se realizó la prueba no paramétrica U de Mann – Whitney para compara las medianas de la concentración de Mn de los niños con NPT (7,290µg/L) respecto a la concentración de Mn en sangre de cordón (7,700 µg/L), observándose que NO existen diferencias estadísticamente significativas,  $p = 0,742 (>0,05)$  entre ellos.

Se analizan los datos para comprobar si se cumple la hipótesis de que al menos el 15% de los niños que reciben NPT tienen una concentración de Mn superior la LSN de nuestra población de referencia (31,008 µg/L)

**Tabla 3-66:** Percentiles de la concentración de Mn en sangre de los niños que reciben NPT

Percentil	Concentración de Mn (µg/L)
70	16,3600
75	16,9500
80	17,5400
85	21,0400
90	24,5400
92	24,5400
95	24,5400

El 95% de los niños con NPT tienen concentración de Mn en sangre menor de 24,54 µg/L, es decir en el grupo de niños estudiado que recibe NPT, no hay un 15% que tenga una concentración de Mn en sangre mayor del LSN de nuestra población de referencia (31,008 µg/L).

Esta hipótesis no se cumple en nuestro caso quizás debido al tamaño muestral.

### 3.13.- NIÑOS CON NPT vs LACTANCIA MATERNA

**Tabla 3-67:** Rangos promedio de la concentración de Mn en sangre en niños con NPT vs niños con lactancia materna.

Nutrición	Rango promedio	Suma de rangos
NPT	17,56	158,00
Leche materna	11,35	193,00

**Tabla 3-68:** Prueba U de Mann-Whitney para comparación de la concentración de Mn en niños con NPT vs niños con lactancia materna

	Mn
U de Mann-Whitney	40,000
W de Wilcoxon	193,000
Z	-1,967
Sig. asintót. (bilateral)	0,049

Se realizó la prueba no paramétrica U de Mann – Whitney para compara las medianas de la concentración de Mn de los niños con NPT (7,290µg/L) respecto a los alimentados con leche materna (4,590 µg/L), observándose que existen diferencias estadísticamente significativas,  $p=0,047$  ( $<0,05$ ) entre ellos.

### 3.14.- NIÑOS CON NPT vs LACTANCIA ARTIFICIAL

**Tabla 3-69:** Rangos promedio de la concentración de Mn en sangre en niños con NPT vs niños con lactancia artificial

Nutrición	Rango promedio	Suma de rangos
NPT	9,44	85,00
Lactancia artificial	8,50	68,00

**Tabla 3-70:** Prueba U de Mann-Whitney para comparación de la concentración de Mn en niños con NPT vs niños con lactancia artificial

	Mn
U de Mann-Whitney	32,000
W de Wilcoxon	68,000
Z	-0,385
Sig. asintót. (bilateral)	0,700

Se realizó la prueba no paramétrica U de Mann – Whitney para compara las medianas de la concentración de Mn en niños con NPT (7,290µg/L) respecto a los alimentados con leche artificial (9,305 µg/L), observándose que NO existen diferencias estadísticamente significativas,  $p = 0,7 \mu\text{g/L}$  ( $>0,05$ ) entre ellos.

### 3.15.- CONCENTRACIÓN DE Mn EN LECHE MATERNA

**Tabla 3-71:** Concentración de Mn en leche materna

	Semanas Gestación	Concentración Mn promedio ( µg/L)
<b>LECHE 1</b>	(34+4) gestación, 6 días	3,705
<b>LECHE 2</b>	(39+6)gestación), 6 días	3,815
<b>LECHE 3</b>	(39+6)gestación, 23 días	2,39
<b>LECHE 4</b>	29 gestación, 34 días	2,08
<b>LECHE 5</b>	(39+4) gestación, 5 días	2,32

No se observan diferencias significativas entre la edad gestacional y la concentración de Mn en sangre materna ( $p=0,592$ ).



### 3.16.- CONCENTRACIÓN DE Mn EN LECHE ARTIFICIAL

*Tabla 3-72: Concentración de Mn en distintas leches artificiales*

<b>LECHE SANUTRI</b>	<b>VALOR TEÓRICO = 52 ( µg/L)</b>
	26,46
	24,5
	25,03
<b>Concentración media Mn (µg/L)</b>	<b>25,33</b>
<b>LECHE MILUPA</b>	<b>VALOR TEÓRICO = 75( µg/L)</b>
	36,72
	30,37
	38,91
<b>Concentración media Mn (µg/L)</b>	<b>35,33</b>
<b>LECHE ALMIRÓN</b>	<b>VALOR TEÓRICO = 75 ( µg/L)</b>
	35,86
	31,62
	36,64
<b>Concentración media Mn (µg/L)</b>	<b>34,76</b>

### 3.17.- CONCENTRACIÓN DE Mn EN NPT

*Tabla 3-73: Concentración de Mn en distintas NPT*

Concentración media de Mn (µg/L)
206,77
136,915
85,125
93,28
101,315
79,095
67,445
65,1
56,625
51,525
50,055
3,885
46,95
2,435
50,88
46,8
86,69
120,72
106,75
136,945
74,355
159,73
49,56
58,23
99,98
87,315
87,315

Concentración media de Mn (µg/L)
79,675
80,39
67,04
71,13
144,65
118,92
139,71
82,57
88,5
95,16
3,76
2,87
74,46
43,46

La recomendación de líquidos para niños que reciben NPT se indica en la siguiente tabla:

**Tabla 3-74:** Recomendación de líquidos en NPT

Peso	1ª semana	> 1 semana
<b>600-999 g</b>	1,5 - 3,5 mL/kg/h (36 - 84 mL/kg/día)	1,5 - 2,3 mL/kg/h (36 - 55 mL/kg/día)
<b>1000 - 1499 g</b>	1,5 - 2,3 mL/kg/h (36-55 mL/kg/día)	1,5 - 2,3 mL/kg/h (36 - 55 mL/kg/día)
<b>1500- 1999 g</b>	0,7 -1 mL/kg/h (16 - 24 mL/kg/día)	0,7 -1 mL/kg/h (16 - 24 mL/kg/día)
<b>&gt; 2500 g</b>	0,5 mL/kg/h (12 mL/kg/día)	0,5 mL/kg/h (12 mL/kg/día)

Estas recomendaciones son modificadas teniendo en cuenta las pérdidas insensibles:

- Cuna con calor radiante: aumentar 50 – 90%
- Fototerapia: aumentar 30 - 50% con fototerapia de luz caliente. No aumentan significativamente si la fototerapia es de luz fría y no aumenta el tránsito digestivo. En incubadora con servocontrol de temperatura no aumentan significativamente.
- Polipnea: aumentar 20 - 30%
- Hipertermia

- Febrícula (< 38°C) intermitente: aumentar 50-100%
- Febrícula constante: aumentar 100-200%
- Sudoración activa (> 37 semanas EG)
- Humidificación de la incubadora: aumentar 50-100%
- Ventilación con aire húmedo: aumentar 20 - 30%
- Hipotiroidismo: aumentar 10%

**Tabla 3-75:** Recomendaciones de la American Society for Clinical Nutrition

Oligoelemento	Prematuros (µg/kg/día)	A término (µg/kg/día)	Peditrace® (µg/mL)
Zinc	400	250	250
Cobre	20	20	20
Selenio	2	2	2
Cromo	0,25	0,25	0,2
<b>Manganeso</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>10</b>
Molibdeno	0,25	0,25	0
Iodo	1	1	1
Hierro	100-200	100-200	57

**Recomendaciones de la American Society for Clinical Nutrition:**

Considerando las concentraciones medias de Mn en leche materna (2,862 µg/L) y la media de las distintas leches artificiales (34,76 µg/L) halladas en el estudio, las ingestas en 24 horas son:

Leche materna: 1,18 microgramos /24 horas

Leche artificial: 16,51 microgramos/24 horas

Las recomendaciones de la Sociedad Americana de Nutrición Clínica son de 1 µg /kg peso al día, si el peso medio es de 2,5 kg, 2,5 µg/ 24 horas, por tanto los niños con nutrición natural reciben una cantidad inferior a la recomendada, mientras que con leches artificiales supera marcadamente la ingesta recomendada.

Respecto a la NPT sin embargo la cantidad introducida no es tan elevada, porque aunque en nuestro estudio el promedio de todas las nutriciones analizadas en todos los días, en los distintos niños, tiene 56 µg/L, es decir 0,056 µg/mL, En neonatos la cantidad máxima de líquido en un niños con un peso de 2500 gramos es de 30 mililitros, 0,5 mL/kg/h (12 mL/kg/día) es decir de 0,672 µg/24 horas.

## 4.- DISCUSIÓN

El presente trabajo trata de valorar la hipótesis de si los neonatos pueden estar en riesgo de intoxicación por manganeso (Mn) cuando reciben nutrición parenteral total (NPT).

El Mn es un nutriente esencial en humanos y animales, ya que es requerido como catalizador de una gran variedad de importantes reacciones enzimáticas, implicadas en el metabolismo y síntesis de neurotransmisores.

A pesar de su esencialidad, altas concentraciones de Mn pueden producir neurotoxicidad debido a la acumulación de Mn en el cerebro, principalmente en los ganglios basales.

Por otro lado, es importante destacar, que exposiciones a altos niveles de Mn durante el desarrollo fetal pueden producir efectos embriotóxicos y fetotóxicos; sin embargo, una cantidad suficiente de Mn es crítica para un normal desarrollo cerebral y óseo, tanto en el periodo prenatal como posnatal, por lo que los neonatos y niños tienen más altos requerimientos de Mn que los adultos.

La absorción de Mn en los niños, particularmente en el periodo neonatal, es mayor que en los adultos; esto adquiere una importancia relevante en aquellos neonatos y niños que tienen disminuida la excreción biliar y a su vez reciben suplementos de Mn en la leche artificial o NPT; debido a que la bilis constituye la principal vía de excreción de Mn.

Por lo tanto, con estas premisas nuestra principal preocupación es el posible efecto tóxico que puede producir una elevada ingesta de Mn en neonatos que reciben NPT y en niños de 1 a 6 meses alimentados con leche artificial; ya que durante la NPT el mecanismo de regulación intestinal normal de Mn es eludido, por lo que el Mn liberado vía intravenosa está 100% biodisponible, lo que puede contribuir a un incremento de Mn en el cerebro y otros tejidos de estos niños.

Para evaluar estas hipótesis, hemos planteado como objetivo principal de este estudio determinar los valores de referencia de Mn en sangre de cordón, con las posibles variables de influencia como la edad materna, edad gestacional, sexo, peso al nacer, Apgar y tipo de parto en nuestra población de neonatos sanos.

Como objetivos secundarios, se ha determinado:

- La concentración de Mn en sangre de niños sanos entre 1 y 6 meses de edad alimentados con leche materna o artificial y niños que reciben NPT.

- La concentración de Mn en leche materna, fórmulas comerciales de leche artificial y preparados de NPT.

En primer lugar, para poder llevar a cabo la cuantificación de Mn, hemos desarrollado y validado un método de análisis mediante espectrofotometría de absorción atómica en horno de grafito con corrección zeeman para muestras biológicas (sangre, leche materna, leche artificial y preparados de nutrición parenteral).

No fue posible analizar directamente estas muestras, debido a la formación de residuos orgánicos que se depositaban en el tubo de grafito y obstruían el paso de luz; lo que originaba señales de absorbancia no reproducibles. Por lo que se decidió llevar a cabo una digestión ácida, tratando las muestras previamente al análisis con  $\text{HNO}_3$  diluido a  $\frac{1}{2}$  para precipitar así las proteínas y evitar las interferencias producidas por la formación de estos residuos orgánicos.

Al mismo tiempo con el objetivo de disminuir las pérdidas de analito debidas a la formación de compuestos volátiles del mismo, se utilizó nitrato de paladio al 2% como modificador, favoreciendo así la estabilidad térmica del analito.

A pesar de estas mejoras seguíamos obteniendo picos poco reproducibles, posiblemente a consecuencia de las interferencias producidas por los compuestos más volátiles de analito, los cuales permanecían estables en el rango de temperatura en la cual se producía la atomización.

Por lo que se decide introducir la plataforma L'Vov. De este modo conseguimos que la muestra se deposite en la plataforma en lugar de en la pared del tubo de grafito, lo que supone que la atomización tenga lugar en un medio en el que no se produce un cambio tan rápido de temperatura y obtenemos picos más reproducibles.

Como esperábamos, al introducir la plataforma L'Vov perdemos sensibilidad.

Para solucionar este problema y reducir el efecto de las interferencias de matriz pasamos a medir el área de pico en lugar de la altura de pico. Calcinando a  $1400\text{ }^{\circ}\text{C}$  y atomizando a  $2600\text{ }^{\circ}\text{C}$ . En estas condiciones conseguimos una señal de fondo apta para el análisis.

Con el fin de conseguir homogeneidad entre los calibradores y las muestras introducimos el método de adiciones estándar, ya que la pendiente de calibración acuosa varía en más de un 10% respecto al método de adiciones estándar, lo que supone un cambio de sensibilidad.

Además de en las condiciones citadas anteriormente:

- Trabajamos en modo STPF, intensidad de lámpara: 4mA, altura de rendija: 0,1nm, ancho de rendija normal, longitud de onda: 279,5nm, fotomultiplicador: 556,2 voltios.
- Empleamos Tritón X100/HNO<sub>3</sub> como detergente para eliminar los residuos carbonosos formados en el interior del tubo de grafito y la adsorción del analito en la superficie de los recipientes, evitando así la obstrucción de la pipeta de muestra y mejorando la dispersión de la muestra en las paredes del tubo de grafito, consiguiendo así unos picos reproducibles.
- Lavamos rigurosamente todo el material con agua regia, HCl:HNO<sub>3</sub> (3:1) y trabajamos con agua pura Milli-Q, para minimizar la contaminación de las muestras durante el análisis, ya que en Mn es un elemento ubicuo en el ambiente.

Finalizada la optimización, pasamos a validar el método según la norma UNE-EN-ISO 17025, determinando la linealidad, límite de detección, límite de cuantificación, precisión, exactitud y repetibilidad.

- Empleando el método de adiciones estándar, se ha determinado el rango de linealidad de la técnica de análisis. Los resultados obtenidos muestran que hasta 45 µg/L de Mn la técnica es lineal.
- El límite de detección o la cantidad mínima de Mn que el método de análisis puede determinar con una intensidad de corriente para la lámpara de 4 mA, es de 0,37 µg/L, por lo que el límite de cuantificación se encuentra cercano a 1,11µg/L.
- La evaluación de la precisión del método se realizó utilizando dos controles certificados de concentraciones crecientes de Mn durante 15 días y realizando todos los días una calibración diferente.
  - La variabilidad intraserial (Sr) es de 0,056% y 0,101% para el control alto y bajo respectivamente.
  - La imprecisión intermedia (SL) es de 0,326 y 0,578 para el control alto y bajo respectivamente.

Los resultados en este rango de trabajo tienen una imprecisión asociada de 5,97% + 0,3 µg/L (imprecisión aceptable <10-15%).

- Exactitud:
  - Intervalo de confianza 95% = (9,77-10,79)  $\mu\text{g/L}$  (control bajo)
  - Intervalo de confianza 95% = (13,44-14,70)  $\mu\text{g/L}$  (control alto)
- Repetibilidad:
  - CV= 7,27% (control bajo).
  - CV= 5,37% (control alto).

El método de análisis desarrollado para la determinación de Mn en muestras biológicas presenta una exactitud y precisión excelentes que lo hacen adecuado para su uso en el Laboratorio Clínico en el seguimiento de pacientes en los que se sospecha una variación patológica en la concentración de Mn, como puede ser el caso de:

- Neonatos y niños con colestasis que reciben una elevada ingesta de Mn al suministrarles NPT o leche artificial.
- Trabajadores sometidos a sobre exposición de Mn en el lugar de trabajo.
- Pacientes anémicos o con disminución de la excreción biliar (enfermedad hepática) expuestos a altos niveles de Mn.
- Pacientes en hemodiálisis cuando el contenido en Mn se incrementa en el líquido de diálisis.

Dada la sencillez del proceso los tiempos de análisis son adecuados para un laboratorio de rutina.

Finalizada la optimización y validación de método, retomamos el objetivo principal de este trabajo determinando los valores de referencia de la concentración de Mn en sangre de cordón de nuestra población de neonatos sana, con las posibles variables de influencia anteriormente citadas.

Los valores de referencia, son aquellos que corresponden al conjunto de la población supuestamente sana. Se estudian a un total de 119 neonatos.

La distribución obtenida presenta una curtosis y asimetría que se aleja de la distribución gaussiana (mediana = 7,74  $\mu\text{g/L}$ ,  $P_{2,5}$  = 2,62  $\mu\text{g/L}$ ,  $P_{97,5}$  = 31,30  $\mu\text{g/L}$ ).



Para establecer estos valores de referencia previos hemos considerado todas las variables que pudiesen alterar la distribución, según los datos previamente consultados en la bibliografía. Los análisis estadísticos realizados sobre la muestra, se han hecho aplicando métodos no paramétricos en lugar de usar la transformación logarítmica para simplificar los resultados presentados, a pesar de sí ser una distribución normal dicha transformación.

En nuestro estudio asumiendo que la distribución no es paramétrica y usando el test de Kruskal – Wallis, hallamos que no existen diferencias estadísticamente significativas entre la concentración de Mn en sangre de cordón ni el Apgar ( $p=0,456$ ), ni el tipo de parto ( $p=0,454$ ), ni el sexo ( $p=0,701$ ), ni el peso al nacer ( $p=0,190$ ) ni la edad gestacional ( $p=0,773$ ), ni la prematuridad ( $p=0,823$ ).

Estos resultados están en concordancia con la mayor parte de la bibliografía consultada.

Algunos autores han encontrado una relación parabólica de U invertida entre los niveles de Mn en sangre materna y el peso de los niños nacidos a término. Una posible explicación de que el peso al nacer se incremente hasta un nivel máximo de Mn en sangre materna, a partir del cual se observa una disminución en el peso, sería el estrés oxidativo causado por los altos niveles de Mn, conduciendo a un fallo en la función y crecimiento celular.

Distinta bibliografía informa de altos niveles de Mn en sangre de cordón respecto a los niveles de Mn encontrados en sangre materna, por lo que podemos extrapolar que la concentración de Mn en sangre de cordón respecto al peso del niño al nacer también tendría una relación parabólica similar. Sin embargo, en nuestros resultados, no observamos una asociación entre la concentración de Mn en el cordón umbilical y el peso al nacer, lo que nos lleva a preguntarnos si los mecanismos implicados en el crecimiento fetal están relacionados con factores placentarios en lugar de celulares. Es necesaria más investigación para dilucidar la regulación y transferencia placentaria del Mn durante el embarazo.

Tampoco encontramos asociación entre la concentración de Mn en sangre de cordón y el sexo, posiblemente porque en esta edad la ferritina es igual en ambos sexos; las diferencias encontradas por otros autores es en edad adulta en la que se refieren al efecto competitivo entre el hierro y el manganeso en el transporte y unión a proteínas.

El efecto de la variable concentración de bilirrubina sérica no llegó a ser significativo, aplicando la prueba de la U de Mann – Whitney por tratarse de una distribución no paramétrica de una variable cuantitativa.

Sin embargo es importante reseñar que la diferencia casi llegó a tener valor estadístico ( $p=0,052$ ) entre la concentración Mn de niños con bilirrubina elevada y la concentración de Mn en sangre de cordón.

La mediana de la concentración de Mn en la sangre de estos niños era de  $10,94 \mu\text{g/L}$ , frente a la concentración de Mn de niños con bilirrubina sérica normal que era de  $7,43 \mu\text{g/L}$ .

Este parámetro puede ser relevante porque aunque la bilirrubina se asocia a procesos colestáticos, en el caso de los neonatos la elevación de la bilirrubina es a expensas de bilirrubina indirecta, no conjugada, procedente de la hemólisis fisiológica por reemplazo neonatal de la hemoglobina fetal. Es importante señalar que los niños incluidos en el grupo de referencia carecían de patología hepática.

En niños de 1 a 6 meses la concentración sanguínea de Mn se esperaba que disminuyese respecto a los neonatos en al menos  $2 \mu\text{g/L}$ , siendo la bajada superior en los que recibían leche materna.

Hemos comprobado que este planteamiento está de acuerdo con los resultados obtenidos. La mediana de concentración de Mn en sangre de cordón en la población de referencia era de  $7,74 \mu\text{g/L}$  en el momento del parto.

Se realiza la prueba no paramétrica U de Mann – Whitney para comparar esta mediana con la mediana de la concentración de Mn en sangre de niños de 1 a 6 meses ( $5,27 \mu\text{g/L}$ ), observándose diferencias estadísticamente significativas,  $p= 0,018$  ( $<0,05$ ).

Esta concentración desciende a  $4,59 \mu\text{g/L}$  en los niños que sólo reciben lactancia natural ( $p=0,003$ ), cumpliéndose así nuestra hipótesis que preveía una disminución de al menos  $2 \mu\text{g/L}$ .

La bibliografía estima que durante la lactancia se secretan unos  $3 \mu\text{g/L}$  de Mn en la leche y esta cantidad parece ser suficiente para que no se observen deficiencias de Mn.

La deficiencia de Mn es rara, por lo que existe poca bibliografía al respecto.

En nuestro estudio las concentraciones medias de Mn en las muestras analizadas en leche materna y leche artificial fueron de 2,86 µg/L y 34,76 µg/L respectivamente; lo que supuso una ingesta de 1,18 µg de Mn al día en niños alimentados con leche materna y de 16,51 µg de Mn al día en los niños alimentados con leche artificial.

La Sociedad Americana de Nutrición Clínica recomienda una ingesta de 1µg/Kg peso/día, si el peso medio de nuestros neonatos es de 2,5 kg, la ingesta recomendada sería de 2,5 µg/24 horas, por vía oral. Por lo tanto encontramos que en nuestra población los niños alimentados con leche artificial superan marcadamente la ingesta recomendada internacionalmente.

Este aumento en la ingesta de Mn se ve reflejado en la concentración de Mn en sangre de los niños alimentados con leche materna (4,59 µg/L) respecto a los niños alimentados con leche artificial (9,305 µg/L), aunque estas diferencias en la concentración no llegan a ser estadísticamente significativas ( $p=0,175$ ) realizando la prueba no paramétrica U de Mann – Whitney, probablemente debido a que las concentraciones de Mn en las muestras de leche artificial analizadas presentaron una gran dispersión.

Este aumento en la ingesta de Mn en los niños alimentados con leche artificial también se ve reflejado en la concentración de Mn en sangre de estos niños.

No se encuentran diferencias estadísticamente significativas ( $p= 0,128$ ), al comparar mediante la prueba no paramétrica U de Mann – Whitney, las medianas de la concentración de Mn de los lactantes de 1 a 6 meses alimentados con leche artificial (9,3µg/L) respecto a los neonatos (7,70µg/L). Ya que como planteábamos anteriormente, se esperaba que la concentración de Mn en niños de 1 a 6 meses disminuyera respecto a la concentración de Mn en neonatos en al menos 2 µg/L, porque los requerimientos de Mn durante el desarrollo fetal son más elevados.

Estos resultados nos hacen pensar que la concentración de Mn en sangre podría ser un útil biomarcador del estado de Mn, ya que parece estar relacionado con la ingesta dietética.

Según la bibliografía se espera que la concentración de Mn en leche materna disminuya de 3 µg/L a 1,87 µg/L a los tres meses.

La concentración de Mn media en la leche materna analizada en nuestra población es de 2,862 µg/L, este valor concuerda con el esperado. No se observan diferencias

significativas entre la edad gestacional y la concentración de Mn en leche materna ( $p=0,592$ ), debido a que la leche analizada en nuestro estudio corresponde a madres que todavía no habían alcanzado los 3 meses post parto.

De los lactantes estudiados, al igual que sucedía con los neonatos, no existen diferencias estadísticamente significativas entre la concentración de Mn en sangre ( $p=0,570$ ) y el sexo por el mismo motivo expuesto anteriormente.

Se partía de la hipótesis de que al menos el 15% de los niños que reciben NPT presentarían concentraciones de Mn superiores al LSN. Sin embargo, no encontramos entre los niños que reciben NPT, ninguno cuya concentración de Mn superase el percentil 97,5 de los recién nacidos, es decir, no hemos encontrado neonatos en NPT con un rango de concentración de Mn compatible con intoxicación.

En el seguimiento de estos pacientes hasta 2015, evaluando sus historias clínicas, no aparecen alteraciones neurológicas que hagan sospechar de un acúmulo de Mn en los ganglios basales.

Como se ha comentado anteriormente, la bilis constituye la principal vía de excreción del Mn, por lo tanto el riesgo potencial de intoxicación es superior en aquellas circunstancias en las que la excreción biliar se encuentra disminuida.

En lactantes con NPT el mecanismo de regulación intestinal es eludido y la cantidad de Mn liberado vía intravenosa está 100% biodisponible.

El Mn es eliminado por vía biliar y estos niños hacen pocas o nada de heces, por lo que es posible que el aumento de las concentraciones sanguíneas conlleve un aumento del depósito de Mn en el sistema nervioso central.

Algunos estudios informan que el 65% de los neonatos con NPT tienen bilirrubina directa superior a 2 mg/dl, de ellos, un 15% evoluciona a daño hepático.

El 95% de nuestros valores de referencia se agruparon entre un valor inferior del percentil 2,5 (2,62  $\mu\text{g/L}$ ) y un valor superior del percentil 97,5 (31,3  $\mu\text{g/L}$ ).

Nos interesa comentar este valor superior, y su comparación con los límites superiores de normalidad dados por otros autores.

El 29% de nuestra población de neonatos tiene concentraciones superiores a los 11,39  $\mu\text{g/L}$  (LSN informado por otros autores).

En la NPT el percentil 95 de las concentraciones fue de 24,54  $\mu\text{g/L}$ , es decir, en el grupo de niños estudiado que recibe NPT, no hay un 15% que tenga una concentración de Mn en sangre mayor del LSN de nuestra población de referencia (31,008  $\mu\text{g/L}$ ).

La mediana de concentración en los niños con NPT (7,290  $\mu\text{g/L}$ ) es significativamente superior ( $p=0,047$ ) a la concentración de los niños sanos de 1 a 6 meses con lactancia materna (4,590  $\mu\text{g/L}$ ).

En nuestra hipótesis planteamos el posible riesgo del acumulo de manganeso.

Con estos datos comprobamos que este riesgo existe y que estos niños no están en franca intoxicación, ni presentan signos ni síntomas de toxicidad, pero este aumento en la mediana de la concentración si es prueba de esa tendencia.

La NPT normalmente contiene Mn como parte de una concentración fija de suplementos de elementos traza, lo que hace difícil ajustar el aporte de Mn sin reducir el de otros elementos traza esenciales como el selenio o el zinc.

La Sociedad Americana de Nutrición Clínica recomienda una ingesta de Mn de 1  $\mu\text{g/Kg}$  peso/día, si el peso medio de nuestros neonatos es de 2,5 kg, la ingesta recomendada sería de 2,5  $\mu\text{g}/24$  horas, por vía oral.

En nuestro estudio observamos que la cantidad de Mn administrada a los neonatos por vía parenteral no era tan elevada, porque aunque el promedio de la concentración de Mn analizado era de 56  $\mu\text{g/L}$  (0,056  $\mu\text{g/mL}$ ). En neonatos la cantidad máxima de líquido para niños con un peso de 2500 gramos es de 12/ $\text{mL/kg/día}$ , es decir, 0,672  $\mu\text{g}/24$  h, quizás por esto en nuestro estudio no se cumple la hipótesis planteada de que el 15% de los niños que reciben NPT superarían el límite superior de la normalidad de nuestra población de referencia de 31  $\mu\text{g/L}$ .

Sin embargo nuestros datos se incluyen en el creciente cuerpo de evidencia de la posible toxicidad del Mn.

Si a la posible toxicidad del Mn le sumamos la escasez de evidencias de casos documentados de deficiencia de Mn, nos llevan a recomendar que no es necesario añadir rutinariamente Mn a los regímenes de NPT.

## 5.- CONCLUSIONES

1. Se ha puesto a punto un método de análisis mediante espectrofotometría de absorción atómica con corrección de fondo Zeeman y horno de grafito; para determinar Mn en muestras biológicas (sangre total, leche materna, leche artificial, NPT), mediante una digestión ácida de las muestras con HNO<sub>3</sub> diluido y utilizando nitrato de paladio al 2% como modificador, favoreciendo así la estabilidad térmica del analito.
2. Se ha utilizado la plataforma L'Vov para reducir las interferencias producidas por los compuestos más volátiles de analito, calcinando a 1400 °C y atomizando a 2600 °C, para reducir el efecto de las interferencias de matriz y mejorar la sensibilidad.
3. Calibramos por el método de adiciones estándar para conseguir homogeneidad entre los calibradores y las muestras, aumentando así la sensibilidad del método y empleamos Tritón X100/HNO<sub>3</sub> como detergente para eliminar los residuos carbonosos formados en el interior del tubo de grafito y la adsorción del analito en la superficie de los recipientes; evitando así la obstrucción de la pipeta de muestra y mejorando la dispersión de la muestra en las paredes del tubo de grafito.
4. Trabajamos en condiciones STPF, intensidad de lámpara: 4mA, altura de rendija: 0,1nm, ancho de rendija normal, longitud de onda: 279,5nm, fotomultiplicador: 556,2 voltios.
5. El método desarrollado para la determinación de Mn en muestras biológicas, presenta una exactitud y precisión excelentes, y tiempos de análisis adecuados para su implantación en el laboratorio clínico de rutina.
6. El 29% de los neonatos estudiados tienen concentraciones de Mn superiores a 11,39 µg/L (LSN informado por otros autores). Los valores de referencia van de 2,62 µg/L a 31,3 µg/L y no se encuentran influenciados ni por el Apgar, tipo de parto, sexo, peso al nacer, edad gestacional y bilirrubina. Aunque el efecto de esta última casi llegó ser significativo.
7. La concentración de Mn en niños de 1 a 6 meses disminuye respecto a la concentración de Mn en neonatos en al menos 2 µg/L. Siendo esta bajada mayor en niños que reciben lactancia materna.

8. Los niños alimentados con leche artificial superan marcadamente la ingesta de Mn recomendada internacionalmente, Por lo que sus niveles de Mn en sangre son superiores a los niños alimentados con leche materna y no descienden como se esperaba respecto a los neonatos. Lo que nos hace pensar que la concentración de Mn en sangre podría ser un útil biomarcador, ya que parece estar relacionado con la ingesta dietética.
9. No hemos encontrado neonatos en NPT con un rango de concentración de Mn compatible con intoxicación. Pero el aumento en la concentración de Mn en los niños con NPT respecto a los alimentados con leche materna, prueba la tendencia de un posible riesgo de intoxicación por acúmulo de Mn. Por lo que nuestros datos se incluyen en el creciente cuerpo de evidencia de la posible toxicidad del Mn.
10. La escasez de evidencias de casos documentados de deficiencia de Mn, nos llevan a recomendar que no es necesario añadir rutinariamente Mn a los regímenes de NPT.

## **6.- ANEXOS**



## ANEXO 1



### CONSENTIMIENTO INFORMADO DEL PACIENTE

#### INFORMACIÓN A LAS MADRES

Actualmente se está realizando en el Hospital Severo Ochoa un estudio sobre la composición en elementos traza de la leche materna.

A usted se le está invitando a participar en este estudio médico.

**Objetivo del estudio:** obtener una base de datos de las concentraciones de elementos traza en leche materna y artificial y en nutrición parenteral recibida por los neonatos del área 9.

En caso de aceptar participar a **donaría 1 mililitro** de su leche.

Sus datos serán completamente anónimos y no recogeremos ningún dato demográfico relacionado, sólo las semanas de lactancia.

#### ACLARACIONES

Su decisión de participar es completamente voluntaria.

No habrá ninguna consecuencia desfavorable para usted si no acepta la invitación.

No tendrá gasto alguno para usted, ni recibirá pago por su participación

Dado que el estudio es completamente anónimo no podremos devolverle información sobre la composición de su leche.

Fdo.

Rita Martínez Manzanal

Bioquímica

Fdo.

Dra. Ersilia González

Pediatría

ANEXO2



**CONSENTIMIENTO INFORMADO DEL PACIENTE**

Yo  
DNI/Pasaporte,

He leído la hoja informativa que me ha sido entregada  
He tenido oportunidad de efectuar preguntas sobre el estudio.  
He recibido respuestas satisfactorias.  
Entiendo que la participación es voluntaria y entiendo que puedo abandonar el estudio:

- Cuando lo desee.
- Sin que tenga que dar explicaciones.
- Sin que ello afecte a mis cuidados médicos.

DOY MI CONSENTIMIENTO SÓLO PARA LA DONACIÓN NECESARIA EN LA INVESTIGACIÓN DE LA QUE SE ME HA INFORMADO Y PARA QUE SEAN UTILIZADAS LAS MUESTRAS.

Declaro que he leído y conozco el contenido del presente documento, comprendo los compromisos que asumo y los acepto expresamente. Y, por ello, firmo este consentimiento informado de forma voluntaria para MANIFESTAR MI DESEO DE PARTICIPAR EN ESTE ESTUDIO DE INVESTIGACIÓN SOBRE EL CONTENIDO DE ELEMENTOS TRAZA EN NEONATOS hasta que decida lo contrario. Al firmar este consentimiento no renuncio a ninguno de mis derechos. Recibiré una copia de este consentimiento para guardarlo y poder consultarlo en el futuro.

Firma:

Fecha:

**Nombre del investigador: Rita Martínez Manzanal**

Firma:

Fecha:

Dirección de contacto del Investigador responsable de la investigación y del tratamiento de los datos:

Dña. Rita Martínez Manzanal  
Bioquímica Clínica. Hospital Severo Ochoa. Leganés. 28911 Madrid.  
Teléfono 914818000 Ext. 8045

## 7.- BIBLIOGRAFÍA

1. Kafritsa, Y., et al., *Long-term outcome of brain manganese deposition in patients on home parenteral nutrition*. Arch Dis Child, 1998. **79**(3): p. 263-5.
2. Torra, M., M. Rodamilans, and J. Corbella, *Biological monitoring of environmental exposure to manganese in blood samples from residents of the city of Barcelona, Spain*. Sci Total Environ, 2002. **289**(1-3): p. 237-41.
3. Spencer, A., *Whole blood manganese levels in pregnancy and the neonate*. Nutrition, 1999. **15**(10): p. 731-4.
4. Archibald, F.S. and C. Tyree, *Manganese poisoning and the attack of trivalent manganese upon catecholamines*. Arch Biochem Biophys, 1987. **256**(2): p. 638-50.
5. Golub, M.S., et al., *Neurobehavioral evaluation of rhesus monkey infants fed cow's milk formula, soy formula, or soy formula with added manganese*. Neurotoxicol Teratol, 2005. **27**(4): p. 615-27.
6. Erikson, K.M., et al., *Interactions between excessive manganese exposures and dietary iron-deficiency in neurodegeneration*. Environ Toxicol Pharmacol, 2005. **19**(3): p. 415-21.
7. Erikson, K.M. and M. Aschner, *Manganese neurotoxicity and glutamate-GABA interaction*. Neurochem Int, 2003. **43**(4-5): p. 475-80.
8. Aschner, J.L. and M. Aschner, *Nutritional aspects of manganese homeostasis*. Mol Aspects Med, 2005. **26**(4-5): p. 353-62.
9. Cotzias, G.C., et al., *Chronic manganese poisoning. Clearance of tissue manganese concentrations with persistence of the neurological picture*. Neurology, 1968. **18**(4): p. 376-82.
10. Soldin, O.P. and M. Aschner, *Effects of manganese on thyroid hormone homeostasis: potential links*. Neurotoxicology, 2007. **28**(5): p. 951-6.
11. Greger, J.L., *Dietary standards for manganese: overlap between nutritional and toxicological studies*. J Nutr, 1998. **128**(2 Suppl): p. 368S-371S.
12. Britton, A.A. and G.C. Cotzias, *Dependence of manganese turnover on intake*. Am J Physiol, 1966. **211**(1): p. 203-6.
13. Zlotkin, S.H., S. Atkinson, and G. Lockitch, *Trace elements in nutrition for premature infants*. Clin Perinatol, 1995. **22**(1): p. 223-40.
14. Finley, J.W., *Manganese absorption and retention by young women is associated with serum ferritin concentration*. Am J Clin Nutr, 1999. **70**(1): p. 37-43.
15. Rossander-Hulten, L., et al., *Competitive inhibition of iron absorption by manganese and zinc in humans*. Am J Clin Nutr, 1991. **54**(1): p. 152-6.
16. Finley, J.W., P.E. Johnson, and L.K. Johnson, *Sex affects manganese absorption and retention by humans from a diet adequate in manganese*. Am J Clin Nutr, 1994. **60**(6): p. 949-55.
17. Davidsson, L., et al., *Intrinsic and extrinsic labeling for studies of manganese absorption in humans*. J Nutr, 1988. **118**(12): p. 1517-21.
18. Sandstrom, B., et al., *Effect of long-term trace element supplementation on blood trace element levels and absorption of (<sup>75</sup>Se), (<sup>54</sup>Mn) and (<sup>65</sup>Zn)*. J Trace Elem Electrolytes Health Dis, 1990. **4**(2): p. 65-72.
19. Garcia-Aranda, J.A., R.A. Wapnir, and F. Lifshitz, *In vivo intestinal absorption of manganese in the rat*. J Nutr, 1983. **113**(12): p. 2601-7.

20. Bell, J.G., C.L. Keen, and B. Lonnerdal, *Higher retention of manganese in suckling than in adult rats is not due to maturational differences in manganese uptake by rat small intestine*. J Toxicol Environ Health, 1989. **26**(4): p. 387-98.
21. Davidsson, L., et al., *Identification of transferrin as the major plasma carrier protein for manganese introduced orally or intravenously or after in vitro addition in the rat*. J Nutr, 1989. **119**(10): p. 1461-4.
22. Rabin, O., et al., *Rapid brain uptake of manganese(II) across the blood-brain barrier*. J Neurochem, 1993. **61**(2): p. 509-17.
23. Davis, C.D., T.L. Wolf, and J.L. Greger, *Varying levels of manganese and iron affect absorption and gut endogenous losses of manganese by rats*. J Nutr, 1992. **122**(6): p. 1300-8.
24. Hauser, R.A., et al., *Manganese intoxication and chronic liver failure*. Ann Neurol, 1994. **36**(6): p. 871-5.
25. Reimund, J.M., et al., *Factors associated to hypermanganesemia in patients receiving home parenteral nutrition*. Clin Nutr, 2000. **19**(5): p. 343-8.
26. Kelly, D.A., *Liver complications of pediatric parenteral nutrition--epidemiology*. Nutrition, 1998. **14**(1): p. 153-7.
27. Fechter, L.D., *Distribution of manganese in development*. Neurotoxicology, 1999. **20**(2-3): p. 197-201.
28. Davis, C.D., L. Zech, and J.L. Greger, *Manganese metabolism in rats: an improved methodology for assessing gut endogenous losses*. Proc Soc Exp Biol Med, 1993. **202**(1): p. 103-8.
29. Freeland-Graves, J.H., et al., *Metabolic balance of manganese in young men consuming diets containing five levels of dietary manganese*. J Nutr, 1988. **118**(6): p. 764-73.
30. Murphy, V.A., et al., *Saturable transport of manganese(II) across the rat blood-brain barrier*. J Neurochem, 1991. **57**(3): p. 948-54.
31. Takeda, A., et al., *Brain uptake of trace metals, zinc and manganese, in rats*. Brain Res, 1994. **640**(1-2): p. 341-4.
32. Aschner, M. and M. Gannon, *Manganese (Mn) transport across the rat blood-brain barrier: saturable and transferrin-dependent transport mechanisms*. Brain Res Bull, 1994. **33**(3): p. 345-9.
33. Erikson, K.M., et al., *Manganese accumulates in iron-deficient rat brain regions in a heterogeneous fashion and is associated with neurochemical alterations*. Biol Trace Elem Res, 2002. **87**(1-3): p. 143-56.
34. Garrick, M.D., et al., *DMT1: a mammalian transporter for multiple metals*. Biometals, 2003. **16**(1): p. 41-54.
35. Tuschl, K., P.B. Mills, and P.T. Clayton, *Manganese and the brain*. Int Rev Neurobiol, 2013. **110**: p. 277-312.
36. Lechpammer, M., et al., *Pathology of inherited manganese transporter deficiency*. Ann Neurol, 2014. **75**(4): p. 608-12.
37. Aschner, M., et al., *Manganese: recent advances in understanding its transport and neurotoxicity*. Toxicol Appl Pharmacol, 2007. **221**(2): p. 131-47.
38. Aisen, P., R. Aasa, and A.G. Redfield, *The chromium, manganese, and cobalt complexes of transferrin*. J Biol Chem, 1969. **244**(17): p. 4628-33.
39. Pardridge, W.M., J. Eisenberg, and J. Yang, *Human blood-brain barrier transferrin receptor*. Metabolism, 1987. **36**(9): p. 892-5.
40. Morris, C.M., et al., *Brain iron homeostasis*. J Inorg Biochem, 1992. **47**(3-4): p. 257-65.

41. Morris, C.M., et al., *Uptake and distribution of iron and transferrin in the adult rat brain*. J Neurochem, 1992. **59**(1): p. 300-6.
42. Suarez, N. and H. Eriksson, *Receptor-mediated endocytosis of a manganese complex of transferrin into neuroblastoma (SHSY5Y) cells in culture*. J Neurochem, 1993. **61**(1): p. 127-31.
43. Slood, W.N. and J.B. Gramsbergen, *Axonal transport of manganese and its relevance to selective neurotoxicity in the rat basal ganglia*. Brain Res, 1994. **657**(1-2): p. 124-32.
44. Aschner, M. and J.L. Aschner, *Manganese transport across the blood-brain barrier: relationship to iron homeostasis*. Brain Res Bull, 1990. **24**(6): p. 857-60.
45. Barbeau, A., N. Inoue, and T. Cloutier, *Role of manganese in dystonia*. Adv Neurol, 1976. **14**: p. 339-52.
46. Walaas, I. and F. Fonnum, *The distribution and origin of glutamate decarboxylase and choline acetyltransferase in ventral pallidum and other basal forebrain regions*. Brain Res, 1979. **177**(2): p. 325-36.
47. Mackenzie, B. and M.A. Hediger, *SLC11 family of H<sup>+</sup>-coupled metal-ion transporters NRAMP1 and DMT1*. Pflugers Arch, 2004. **447**(5): p. 571-9.
48. Conrad, M.E. and J.N. Umbreit, *Pathways of iron absorption*. Blood Cells Mol Dis, 2002. **29**(3): p. 336-55.
49. Roth, J.A. and M.D. Garrick, *Iron interactions and other biological reactions mediating the physiological and toxic actions of manganese*. Biochem Pharmacol, 2003. **66**(1): p. 1-13.
50. Chua, A.C. and E.H. Morgan, *Manganese metabolism is impaired in the Belgrade laboratory rat*. J Comp Physiol B, 1997. **167**(5): p. 361-9.
51. Fitsanakis, V.A., et al., *Manganese transport by rat brain endothelial (RBE4) cell-based transwell model in the presence of astrocyte conditioned media*. J Neurosci Res, 2005. **81**(2): p. 235-43.
52. Rosakis, A. and W. Koster, *Transition metal transport in the green microalga Chlamydomonas reinhardtii--genomic sequence analysis*. Res Microbiol, 2004. **155**(3): p. 201-10.
53. Rosakis, A. and W. Koster, *Divalent metal transport in the green microalga Chlamydomonas reinhardtii is mediated by a protein similar to prokaryotic Nramp homologues*. Biometals, 2005. **18**(1): p. 107-20.
54. Crossgrove, J.S. and R.A. Yokel, *Manganese distribution across the blood-brain barrier III. The divalent metal transporter-1 is not the major mechanism mediating brain manganese uptake*. Neurotoxicology, 2004. **25**(3): p. 451-60.
55. Crossgrove, J.S., et al., *Manganese distribution across the blood-brain barrier. I. Evidence for carrier-mediated influx of manganese citrate as well as manganese and manganese transferrin*. Neurotoxicology, 2003. **24**(1): p. 3-13.
56. Eide, D.J., *The SLC39 family of metal ion transporters*. Pflugers Arch, 2004. **447**(5): p. 796-800.
57. He, L., et al., *ZIP8, member of the solute-carrier-39 (SLC39) metal-transporter family: characterization of transporter properties*. Mol Pharmacol, 2006. **70**(1): p. 171-80.
58. Keen, C.L., et al., *Nutritional aspects of manganese from experimental studies*. Neurotoxicology, 1999. **20**(2-3): p. 213-23.
59. Kaur, B. and J. Henry, *Micronutrient status in type 2 diabetes: a review*. Adv Food Nutr Res, 2014. **71**: p. 55-100.
60. Okano, T., *[Effects of essential trace elements on bone turnover--in relation to the osteoporosis]*. Nihon Rinsho, 1996. **54**(1): p. 148-54.



61. Palacios, C., *The role of nutrients in bone health, from A to Z*. Crit Rev Food Sci Nutr, 2006. **46**(8): p. 621-8.
62. Bolze, M.S., et al., *Influence of manganese on growth, somatomedin and glycosaminoglycan metabolism*. J Nutr, 1985. **115**(3): p. 352-8.
63. Freeland-Graves, J.H. and J.R. Turnlund, *Deliberations and evaluations of the approaches, endpoints and paradigms for manganese and molybdenum dietary recommendations*. J Nutr, 1996. **126**(9 Suppl): p. 2435S-2440S.
64. Strause, L., P. Saltman, and J. Glowacki, *The effect of deficiencies of manganese and copper on osteoinduction and on resorption of bone particles in rats*. Calcif Tissue Int, 1987. **41**(3): p. 145-50.
65. Friedman, B.J., et al., *Manganese balance and clinical observations in young men fed a manganese-deficient diet*. J Nutr, 1987. **117**(1): p. 133-43.
66. Al-Jameil, N., et al., *Analysis of serum trace elements-copper, manganese and zinc in preeclamptic pregnant women by inductively coupled plasma optical emission spectrometry: a prospective case controlled study in Riyadh, Saudi Arabia*. Int J Clin Exp Pathol, 2014. **7**(5): p. 1900-10.
67. Sarwar, M.S., et al., *Comparative study of serum zinc, copper, manganese, and iron in preeclamptic pregnant women*. Biol Trace Elem Res, 2013. **154**(1): p. 14-20.
68. Gonzalez-Dominguez, R., T. Garcia-Barrera, and J.L. Gomez-Ariza, *Homeostasis of metals in the progression of Alzheimer's disease*. Biometals, 2014. **27**(3): p. 539-49.
69. Davidsson, L., et al., *Manganese retention in man: a method for estimating manganese absorption in man*. Am J Clin Nutr, 1989. **49**(1): p. 170-9.
70. Yamada, M., et al., *Estimation of intakes of copper, zinc, and manganese in Japanese adults using 16-day semi-weighed diet records*. Asia Pac J Clin Nutr, 2014. **23**(3): p. 465-72.
71. Hunt, J.R., L.A. Matthys, and L.K. Johnson, *Zinc absorption, mineral balance, and blood lipids in women consuming controlled lactoovovegetarian and omnivorous diets for 8 wk*. Am J Clin Nutr, 1998. **67**(3): p. 421-30.
72. Greger, J.L., et al., *Calcium, magnesium, phosphorus, copper, and manganese balance in adolescent females*. Am J Clin Nutr, 1978. **31**(1): p. 117-21.
73. Greger, J.L., *Nutrition versus toxicology of manganese in humans: evaluation of potential biomarkers*. Neurotoxicology, 1999. **20**(2-3): p. 205-12.
74. Lutz, T.A., A. Schroff, and E. Scharrer, *Effects of calcium and sugars on intestinal manganese absorption*. Biol Trace Elem Res, 1993. **39**(2-3): p. 221-7.
75. Davidsson, L., et al., *The effect of individual dietary components on manganese absorption in humans*. Am J Clin Nutr, 1991. **54**(6): p. 1065-70.
76. Davidsson, L., et al., *Manganese absorption in humans: the effect of phytic acid and ascorbic acid in soy formula*. Am J Clin Nutr, 1995. **62**(5): p. 984-7.
77. do Nascimento da Silva, E., et al., *Evaluation of the bioaccessible fractions of Fe, Zn, Cu and Mn in baby foods*. Talanta, 2013. **117**: p. 184-8.
78. Aquilio, E., et al., *Trace element content in human milk during lactation of preterm newborns*. Biol Trace Elem Res, 1996. **51**(1): p. 63-70.
79. Lonnerdal, B., C.L. Keen, and L.S. Hurley, *Iron, copper, zinc, and manganese in milk*. Annu Rev Nutr, 1981. **1**: p. 149-74.
80. Davidsson, L., et al., *Manganese absorption from human milk, cow's milk, and infant formulas in humans*. Am J Dis Child, 1989. **143**(7): p. 823-7.
81. Sanchez, D.J., et al., *Maternal and developmental toxicity of manganese in the mouse*. Toxicol Lett, 1993. **69**(1): p. 45-52.

82. Colomina, M.T., et al., *Effect of day of exposure on the developmental toxicity of manganese in mice*. Vet Hum Toxicol, 1996. **38**(1): p. 7-9.
83. Xue, F., et al., *Maternal fish consumption, mercury levels, and risk of preterm delivery*. Environ Health Perspect, 2007. **115**(1): p. 42-7.
84. Hernandez-Avila, M., et al., *Effect of maternal bone lead on length and head circumference of newborns and 1-month-old infants*. Arch Environ Health, 2002. **57**(5): p. 482-8.
85. Gonzalez-Cossio, T., et al., *Decrease in birth weight in relation to maternal bone-lead burden*. Pediatrics, 1997. **100**(5): p. 856-62.
86. Mora, A.M., et al., *Blood and hair manganese concentrations in pregnant women from the infants' environmental health study (ISA) in Costa Rica*. Environ Sci Technol, 2014. **48**(6): p. 3467-76.
87. Basu, R., et al., *Effects of fine particulate matter and its constituents on low birth weight among full-term infants in California*. Environ Res, 2014. **128**: p. 42-51.
88. Zota, A.R., et al., *Maternal blood manganese levels and infant birth weight*. Epidemiology, 2009. **20**(3): p. 367-73.
89. Guan, H., et al., *Manganese concentrations in maternal and umbilical cord blood: related to birth size and environmental factors*. Eur J Public Health, 2014. **24**(1): p. 150-7.
90. Vigeh, M., et al., *Blood manganese concentrations and intrauterine growth restriction*. Reprod Toxicol, 2008. **25**(2): p. 219-23.
91. Chen, L., et al., *Manganese concentrations in maternal-infant blood and birth weight*. Environ Sci Pollut Res Int, 2014. **21**(9): p. 6170-5.
92. Eum, J.H., et al., *Maternal blood manganese level and birth weight: a MOCEH birth cohort study*. Environ Health, 2014. **13**(1): p. 31.
93. Yu, X., L. Cao, and X. Yu, *Elevated cord serum manganese level is associated with a neonatal high ponderal index*. Environ Res, 2013. **121**: p. 79-83.
94. Yazbeck, C., et al., *Effect of maternal manganese blood levels on erythrocyte calcium-pump activity in newborns*. Sci Total Environ, 2006. **354**(1): p. 28-34.
95. Takser, L., et al., *Manganese levels during pregnancy and at birth: relation to environmental factors and smoking in a Southwest Quebec population*. Environ Res, 2004. **95**(2): p. 119-25.
96. Sorensen, H.T., et al., *Birth weight and cognitive function in young adult life: historical cohort study*. BMJ, 1997. **315**(7105): p. 401-3.
97. Wright, R.O., et al., *Neuropsychological correlates of hair arsenic, manganese, and cadmium levels in school-age children residing near a hazardous waste site*. Neurotoxicology, 2006. **27**(2): p. 210-6.
98. Wasserman, G.A., et al., *Water manganese exposure and children's intellectual function in Araihasar, Bangladesh*. Environ Health Perspect, 2006. **114**(1): p. 124-9.
99. Dorman, D.C., et al., *Neurotoxicity of manganese chloride in neonatal and adult CD rats following subchronic (21-day) high-dose oral exposure*. J Appl Toxicol, 2000. **20**(3): p. 179-87.
100. Kontur, P.J. and L.D. Fechter, *Brain regional manganese levels and monoamine metabolism in manganese-treated neonatal rats*. Neurotoxicol Teratol, 1988. **10**(4): p. 295-303.
101. Chandra, S.V. and G.S. Shukla, *Manganese encephalopathy in growing rats*. Environ Res, 1978. **15**(1): p. 28-37.
102. Ballatori, N., E. Miles, and T.W. Clarkson, *Homeostatic control of manganese excretion in the neonatal rat*. Am J Physiol, 1987. **252**(5 Pt 2): p. R842-7.

103. Chung, S.E., et al., *Maternal Blood Manganese and Early Neurodevelopment: The Mothers and Children's Environmental Health (MOCEH) Study*. Environ Health Perspect, 2015.
104. Yu, X.D., et al., *Prenatal exposure to manganese at environment relevant level and neonatal neurobehavioral development*. Environ Res, 2014. **133**: p. 232-8.
105. Liu, J., et al., *Placental concentrations of manganese and the risk of fetal neural tube defects*. J Trace Elem Med Biol, 2013. **27**(4): p. 322-5.
106. Lin, C.C., et al., *In utero exposure to environmental lead and manganese and neurodevelopment at 2 years of age*. Environ Res, 2013. **123**: p. 52-7.
107. Yang, X., et al., *Selenium protects neonates against neurotoxicity from prenatal exposure to manganese*. PLoS One, 2014. **9**(1): p. e86611.
108. Arnold, A.M., et al., *A novel dynamin III isoform is up-regulated in the central nervous system in hypothyroidism*. Int J Dev Neurosci, 2003. **21**(5): p. 267-75.
109. Lavado-Autric, R., et al., *Early maternal hypothyroxinemia alters histogenesis and cerebral cortex cytoarchitecture of the progeny*. J Clin Invest, 2003. **111**(7): p. 1073-82.
110. Bowler, R.M., et al., *Manganese exposure: neuropsychological and neurological symptoms and effects in welders*. Neurotoxicology, 2006. **27**(3): p. 315-26.
111. Jiang, Y.M., et al., *Effective treatment of manganese-induced occupational Parkinsonism with p-aminosalicylic acid: a case of 17-year follow-up study*. J Occup Environ Med, 2006. **48**(6): p. 644-9.
112. Myers, J.E., et al., *The nervous system effects of occupational exposure on workers in a South African manganese smelter*. Neurotoxicology, 2003. **24**(6): p. 885-94.
113. Levy, B.S. and W.J. Nassetta, *Neurologic effects of manganese in humans: a review*. Int J Occup Environ Health, 2003. **9**(2): p. 153-63.
114. Ono, K., K. Komai, and M. Yamada, *Myoclonic involuntary movement associated with chronic manganese poisoning*. J Neurol Sci, 2002. **199**(1-2): p. 93-6.
115. Huang, C.C., et al., *Chronic manganese intoxication*. Arch Neurol, 1989. **46**(10): p. 1104-6.
116. Roels, H., et al., *Relationship between external and internal parameters of exposure to manganese in workers from a manganese oxide and salt producing plant*. Am J Ind Med, 1987. **11**(3): p. 297-305.
117. Chandra, S.V., et al., *An exploratory study of manganese exposure to welders*. Clin Toxicol, 1981. **18**(4): p. 407-16.
118. Mena, I., et al., *Chronic manganese poisoning. Clinical picture and manganese turnover*. Neurology, 1967. **17**(2): p. 128-36.
119. Kondakis, X.G., et al., *Possible health effects of high manganese concentration in drinking water*. Arch Environ Health, 1989. **44**(3): p. 175-8.
120. Oikawa, S., et al., *Mechanism for manganese enhancement of dopamine-induced oxidative DNA damage and neuronal cell death*. Free Radic Biol Med, 2006. **41**(5): p. 748-56.
121. Ciubotariu, D. and M. Nechifor, *Manganese interactions with dopaminergic system*. Rev Med Chir Soc Med Nat Iasi, 2013. **117**(1): p. 107-12.
122. Martinez-Finley, E.J., et al., *Manganese neurotoxicity and the role of reactive oxygen species*. Free Radic Biol Med, 2013. **62**: p. 65-75.
123. Sidoryk-Wegrzynowicz, M. and M. Aschner, *Manganese toxicity in the central nervous system: the glutamine/glutamate-gamma-aminobutyric acid cycle*. J Intern Med, 2013. **273**(5): p. 466-77.



124. Sidoryk-Wegrzynowicz, M. and M. Aschner, *Role of astrocytes in manganese mediated neurotoxicity*. BMC Pharmacol Toxicol, 2013. **14**: p. 23.
125. Stredrick, D.L., et al., *Manganese-induced cytotoxicity in dopamine-producing cells*. Neurotoxicology, 2004. **25**(4): p. 543-53.
126. Pal, P.K., A. Samii, and D.B. Calne, *Manganese neurotoxicity: a review of clinical features, imaging and pathology*. Neurotoxicology, 1999. **20**(2-3): p. 227-38.
127. Calne, D.B., et al., *Manganism and idiopathic parkinsonism: similarities and differences*. Neurology, 1994. **44**(9): p. 1583-6.
128. Chia, S.E., et al., *Neurobehavioral functions among workers exposed to manganese ore*. Scand J Work Environ Health, 1993. **19**(4): p. 264-70.
129. Meyer-Baron, M., et al., *The neurobehavioral impact of manganese: results and challenges obtained by a meta-analysis of individual participant data*. Neurotoxicology, 2013. **36**: p. 1-9.
130. Roels, H., et al., *Epidemiological survey among workers exposed to manganese: effects on lung, central nervous system, and some biological indices*. Am J Ind Med, 1987. **11**(3): p. 307-27.
131. Josephs, K.A., et al., *Neurologic manifestations in welders with pallidal MRI T1 hyperintensity*. Neurology, 2005. **64**(12): p. 2033-9.
132. Bowler, R.M., et al., *Neuropsychological sequelae of exposure to welding fumes in a group of occupationally exposed men*. Int J Hyg Environ Health, 2003. **206**(6): p. 517-29.
133. Lucchini, R., et al., *Neurobehavioral effects of manganese in workers from a ferroalloy plant after temporary cessation of exposure*. Scand J Work Environ Health, 1995. **21**(2): p. 143-9.
134. Roels, H.A., et al., *Assessment of the permissible exposure level to manganese in workers exposed to manganese dioxide dust*. Br J Ind Med, 1992. **49**(1): p. 25-34.
135. Viana, G.F., et al., *Noninvasive biomarkers of manganese exposure and neuropsychological effects in environmentally exposed adults in Brazil*. Toxicol Lett, 2014. **231**(2): p. 169-78.
136. Polanska, K., J. Jurewicz, and W. Hanke, *Review of current evidence on the impact of pesticides, polychlorinated biphenyls and selected metals on attention deficit / hyperactivity disorder in children*. Int J Occup Med Environ Health, 2013. **26**(1): p. 16-38.
137. Llop, S., et al., *Gender differences in the neurotoxicity of metals in children*. Toxicology, 2013. **311**(1-2): p. 3-12.
138. Rink, S.M., et al., *Associations between hair manganese levels and cognitive, language, and motor development in preschool children from Montevideo, Uruguay*. Arch Environ Occup Health, 2014. **69**(1): p. 46-54.
139. Bhang, S.Y., et al., *Relationship between blood manganese levels and children's attention, cognition, behavior, and academic performance--a nationwide cross-sectional study*. Environ Res, 2013. **126**: p. 9-16.
140. Rahbar, M.H., et al., *Blood manganese concentrations in Jamaican children with and without autism spectrum disorders*. Environ Health, 2014. **13**: p. 69.
141. Rodriguez-Barranco, M., et al., *Association of arsenic, cadmium and manganese exposure with neurodevelopment and behavioural disorders in children: a systematic review and meta-analysis*. Sci Total Environ, 2013. **454-455**: p. 562-77.

142. Zoni, S. and R.G. Lucchini, *Manganese exposure: cognitive, motor and behavioral effects on children: a review of recent findings*. Curr Opin Pediatr, 2013. **25**(2): p. 255-60.
143. Claus Henn, B., B.A. Coull, and R.O. Wright, *Chemical mixtures and children's health*. Curr Opin Pediatr, 2014. **26**(2): p. 223-9.
144. Torres-Agustin, R., et al., *Effect of environmental manganese exposure on verbal learning and memory in Mexican children*. Environ Res, 2013. **121**: p. 39-44.
145. Li, G.J., et al., *Occupational exposure to welding fume among welders: alterations of manganese, iron, zinc, copper, and lead in body fluids and the oxidative stress status*. J Occup Environ Med, 2004. **46**(3): p. 241-8.
146. Rahman, M.A., B. Rahman, and N. Ahmed, *High blood manganese in iron-deficient children in Karachi*. Public Health Nutr, 2013. **16**(9): p. 1677-83.
147. Park, S., et al., *Blood manganese concentration is elevated in infants with iron deficiency*. Biol Trace Elem Res, 2013. **155**(2): p. 184-9.
148. Smith, E.A., et al., *Increased whole blood manganese concentrations observed in children with iron deficiency anaemia*. J Trace Elem Med Biol, 2013. **27**(1): p. 65-9.
149. Lu, L., et al., *Alteration of serum concentrations of manganese, iron, ferritin, and transferrin receptor following exposure to welding fumes among career welders*. Neurotoxicology, 2005. **26**(2): p. 257-65.
150. Zheng, W., et al., *Alteration of iron homeostasis following chronic exposure to manganese in rats*. Brain Res, 1999. **833**(1): p. 125-32.
151. Li, G.J., Q. Zhao, and W. Zheng, *Alteration at translational but not transcriptional level of transferrin receptor expression following manganese exposure at the blood-CSF barrier in vitro*. Toxicol Appl Pharmacol, 2005. **205**(2): p. 188-200.
152. Li, G.J., et al., *Molecular mechanism of distorted iron regulation in the blood-CSF barrier and regional blood-brain barrier following in vivo subchronic manganese exposure*. Neurotoxicology, 2006. **27**(5): p. 737-44.
153. Loeffler, D.A., et al., *Transferrin and iron in normal, Alzheimer's disease, and Parkinson's disease brain regions*. J Neurochem, 1995. **65**(2): p. 710-24.
154. Dickerson, R.N., *Manganese intoxication and parenteral nutrition*. Nutrition, 2001. **17**(7-8): p. 689-93.
155. Hardy, G., *Manganese in parenteral nutrition: who, when, and why should we supplement?* Gastroenterology, 2009. **137**(5 Suppl): p. S29-35.
156. Siepler, J.K., et al., *Asymptomatic hypermanganesemia in long-term home parenteral nutrition patients*. Nutr Clin Pract, 2003. **18**(5): p. 370-3.
157. McMillan, N.B., et al., *Correlation of cholestasis with serum copper and whole-blood manganese levels in pediatric patients*. Nutr Clin Pract, 2008. **23**(2): p. 161-5.
158. Howard, L., et al., *Autopsy tissue trace elements in 8 long-term parenteral nutrition patients who received the current U.S. Food and Drug Administration formulation*. JPEN J Parenter Enteral Nutr, 2007. **31**(5): p. 388-96.
159. Milatovic, D., et al., *Manganese induces oxidative impairment in cultured rat astrocytes*. Toxicol Sci, 2007. **98**(1): p. 198-205.
160. Mirtallo, J., et al., *Safe practices for parenteral nutrition*. JPEN J Parenter Enteral Nutr, 2004. **28**(6): p. S39-70.
161. Koletzko, B., et al., *1. Guidelines on Paediatric Parenteral Nutrition of the European Society of Paediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition (ESPGHAN) and the European Society for Clinical Nutrition and Metabolism*

- (ESPEN), *Supported by the European Society of Paediatric Research (ESPR)*. J Pediatr Gastroenterol Nutr, 2005. **41 Suppl 2**: p. S1-87.
162. Pluhator-Murton, M.M., et al., *Trace element contamination of total parenteral nutrition. I. Contribution of component solutions*. JPEN J Parenter Enteral Nutr, 1999. **23**(4): p. 222-7.
163. Buchman, A.L., et al., *Organ heavy-metal accumulation during parenteral nutrition is associated with pathologic abnormalities in rats*. Nutrition, 2001. **17**(7-8): p. 600-6.
164. Takagi, Y., et al., *Evaluation of indexes of in vivo manganese status and the optimal intravenous dose for adult patients undergoing home parenteral nutrition*. Am J Clin Nutr, 2002. **75**(1): p. 112-8.
165. Hardy, I.J., L. Gillanders, and G. Hardy, *Is manganese an essential supplement for parenteral nutrition?* Curr Opin Clin Nutr Metab Care, 2008. **11**(3): p. 289-96.
166. Abdalian, R., et al., *Prescription of trace elements in adults on home parenteral nutrition: current practice based on the Canadian Home Parenteral Nutrition Registry*. JPEN J Parenter Enteral Nutr, 2013. **37**(3): p. 410-5.
167. Abdalian, R., et al., *Effects of manganese from a commercial multi-trace element supplement in a population sample of Canadian patients on long-term parenteral nutrition*. JPEN J Parenter Enteral Nutr, 2013. **37**(4): p. 538-43.
168. Osland, E.J., et al., *Australasian Society for Parenteral and Enteral Nutrition guidelines for supplementation of trace elements during parenteral nutrition*. Asia Pac J Clin Nutr, 2014. **23**(4): p. 545-54.
169. Spahr, L., et al., *Increased blood manganese in cirrhotic patients: relationship to pallidal magnetic resonance signal hyperintensity and neurological symptoms*. Hepatology, 1996. **24**(5): p. 1116-20.
170. Albrecht, J. and E.A. Jones, *Hepatic encephalopathy: molecular mechanisms underlying the clinical syndrome*. J Neurol Sci, 1999. **170**(2): p. 138-46.
171. Norenberg, M.D., et al., *Hepatic encephalopathy: a disorder in glial-neuronal communication*. Prog Brain Res, 1992. **94**: p. 261-9.
172. Habrat, B., et al., *[Encephalopathy caused by intravenous potassium permanganate used for illegal production of methcathinone (ephedrone) from medicines containing pseudoephedrine]*. Przegl Lek, 2013. **70**(8): p. 613-6.
173. Jog, M.S. and A.E. Lang, *Chronic acquired hepatocerebral degeneration: case reports and new insights*. Mov Disord, 1995. **10**(6): p. 714-22.
174. Kosenko, E., et al., *Brain ATP depletion induced by acute ammonia intoxication in rats is mediated by activation of the NMDA receptor and Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase*. J Neurochem, 1994. **63**(6): p. 2172-8.
175. Mousseau, D.D., et al., *Selective loss of pallidal dopamine D2 receptor density in hepatic encephalopathy*. Neurosci Lett, 1993. **162**(1-2): p. 192-6.
176. Krieger, D., et al., *Manganese and chronic hepatic encephalopathy*. Lancet, 1995. **346**(8970): p. 270-4.
177. Kulisevsky, J., J. Rusalleda, and J.M. Grau, *MR imaging of acquired hepatocerebral degeneration*. AJNR Am J Neuroradiol, 1991. **12**(3): p. 527-8.
178. Inoue, E., et al., *Portal-systemic encephalopathy: presence of basal ganglia lesions with high signal intensity on MR images*. Radiology, 1991. **179**(2): p. 551-5.
179. Mirowitz, S.A., T.J. Westrich, and J.D. Hirsch, *Hyperintense basal ganglia on T1-weighted MR images in patients receiving parenteral nutrition*. Radiology, 1991. **181**(1): p. 117-20.

180. Pujol, A., et al., *Hyperintense globus pallidus on T1-weighted MRI in cirrhotic patients is associated with severity of liver failure*. *Neurology*, 1993. **43**(1): p. 65-9.
181. Mirowitz, S.A. and T.J. Westrich, *Basal ganglial signal intensity alterations: reversal after discontinuation of parenteral manganese administration*. *Radiology*, 1992. **185**(2): p. 535-6.
182. Saito, H. and A. Ejima, *Liver dysfunction and probable manganese accumulation in the brainstem and basal ganglia*. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 1995. **58**(6): p. 760-1.
183. Jenner, P., *Oxidative mechanisms in nigral cell death in Parkinson's disease*. *Mov Disord*, 1998. **13 Suppl 1**: p. 24-34.
184. Racette, B.A., et al., *Prevalence of parkinsonism and relationship to exposure in a large sample of Alabama welders*. *Neurology*, 2005. **64**(2): p. 230-5.
185. Racette, B.A., et al., *[18F]FDOPA PET and clinical features in parkinsonism due to manganism*. *Mov Disord*, 2005. **20**(4): p. 492-6.
186. Kumudini, N., et al., *Association of Parkinson's disease with altered serum levels of lead and transition metals among South Indian subjects*. *Indian J Biochem Biophys*, 2014. **51**(2): p. 121-6.
187. Olanow, C.W., *Manganese-induced parkinsonism and Parkinson's disease*. *Ann N Y Acad Sci*, 2004. **1012**: p. 209-23.
188. Fudalej, S., et al., *Manganese-induced Parkinsonism among ephedrone users and drug policy in Poland*. *J Addict Med*, 2013. **7**(4): p. 302-3.
189. Avila, D.S., R.L. Puntel, and M. Aschner, *Manganese in health and disease*. *Met Ions Life Sci*, 2013. **13**: p. 199-227.
190. Bowman, A.B. and M. Aschner, *Considerations on manganese (Mn) treatments for in vitro studies*. *Neurotoxicology*, 2014. **41**: p. 141-2.
191. Yamada, M., et al., *Chronic manganese poisoning: a neuropathological study with determination of manganese distribution in the brain*. *Acta Neuropathol*, 1986. **70**(3-4): p. 273-8.
192. Pirker, W., et al., *Progression of dopaminergic degeneration in Parkinson's disease and atypical parkinsonism: a longitudinal beta-CIT SPECT study*. *Mov Disord*, 2002. **17**(1): p. 45-53.
193. Wolters, E.C., et al., *Positron emission tomography in manganese intoxication*. *Ann Neurol*, 1989. **26**(5): p. 647-51.
194. Vingerhoets, F.J., et al., *Longitudinal fluorodopa positron emission tomographic studies of the evolution of idiopathic parkinsonism*. *Ann Neurol*, 1994. **36**(5): p. 759-64.
195. Huang, C.C., et al., *Dopamine transporter binding in chronic manganese intoxication*. *J Neurol*, 2003. **250**(11): p. 1335-9.
196. Cersosimo, M.G. and W.C. Koller, *The diagnosis of manganese-induced parkinsonism*. *Neurotoxicology*, 2006. **27**(3): p. 340-6.
197. Walter, U., et al., *Brain parenchyma sonography discriminates Parkinson's disease and atypical parkinsonian syndromes*. *Neurology*, 2003. **60**(1): p. 74-7.
198. Lu, C.S., et al., *Levodopa failure in chronic manganism*. *Neurology*, 1994. **44**(9): p. 1600-2.
199. Baker, M.G., et al., *Blood manganese as an exposure biomarker: state of the evidence*. *J Occup Environ Hyg*, 2014. **11**(4): p. 210-7.
200. Baker, M.G., et al., *Variance components of short-term biomarkers of manganese exposure in an inception cohort of welding trainees*. *J Trace Elem Med Biol*, 2015. **29**: p. 123-9.



201. Oulhote, Y., D. Mergler, and M.F. Bouchard, *Sex- and age-differences in blood manganese levels in the U.S. general population: national health and nutrition examination survey 2011-2012*. Environ Health, 2014. **13**: p. 87.
202. Davis, C.D. and J.L. Greger, *Longitudinal changes of manganese-dependent superoxide dismutase and other indexes of manganese and iron status in women*. Am J Clin Nutr, 1992. **55**(3): p. 747-52.
203. Greger, J.L., et al., *Intake, serum concentrations, and urinary excretion of manganese by adult males*. Am J Clin Nutr, 1990. **51**(3): p. 457-61.
204. Persoons, R., et al., *Determinants of occupational exposure to metals by gas metal arc welding and risk management measures: a biomonitoring study*. Toxicol Lett, 2014. **231**(2): p. 135-41.
205. Crossgrove, J. and W. Zheng, *Manganese toxicity upon overexposure*. NMR Biomed, 2004. **17**(8): p. 544-53.
206. Eastman, R.R., et al., *Hair as a biomarker of environmental manganese exposure*. Environ Sci Technol, 2013. **47**(3): p. 1629-37.
207. Iwase, K., et al., *Hyperintense basal ganglia on T1-weighted magnetic resonance images following postoperative parenteral nutrition in a pancreatoduodenectomized patient*. Dig Surg, 2000. **17**(2): p. 190-3.
208. McKinney, A.M., et al., *Diffusion abnormalities of the globi pallidi in manganese neurotoxicity*. Neuroradiology, 2004. **46**(4): p. 291-5.
209. Kim, Y., et al., *Increase in signal intensities on T1-weighted magnetic resonance images in asymptomatic manganese-exposed workers*. Neurotoxicology, 1999. **20**(6): p. 901-7.
210. Dreosti, I.E., S.J. Manuel, and R.A. Buckley, *Superoxide dismutase (EC 1.15.1.1), manganese and the effect of ethanol in adult and foetal rats*. Br J Nutr, 1982. **48**(2): p. 205-10.
211. Davis, C.D., D.M. Ney, and J.L. Greger, *Manganese, iron and lipid interactions in rats*. J Nutr, 1990. **120**(5): p. 507-13.
212. Lee, J.W., *Manganese intoxication*. Arch Neurol, 2000. **57**(4): p. 597-9.
213. Huang, C.C., et al., *Progression after chronic manganese exposure*. Neurology, 1993. **43**(8): p. 1479-83.
214. von Holst, H., K. Ericson, and G. Edner, *Positron emission tomography with 68-Ga-EDTA and computed tomography in patients with subarachnoid haemorrhage*. Acta Neurochir (Wien), 1989. **97**(3-4): p. 146-9.
215. Discalzi, G., et al., *Occupational Mn parkinsonism: magnetic resonance imaging and clinical patterns following CaNa2-EDTA chelation*. Neurotoxicology, 2000. **21**(5): p. 863-6.
216. Cronje, L. and L. Bornman, *Iron overload and tuberculosis: a case for iron chelation therapy*. Int J Tuberc Lung Dis, 2005. **9**(1): p. 2-9.
217. Ky, S.Q., et al., *A report of two cases of chronic serious manganese poisoning treated with sodium para-aminosalicylic acid*. Br J Ind Med, 1992. **49**(1): p. 66-9.
218. Jiang, Y., et al., *Brain magnetic resonance imaging and manganese concentrations in red blood cells of smelting workers: search for biomarkers of manganese exposure*. Neurotoxicology, 2007. **28**(1): p. 126-35.
219. Neville, M.C., et al., *Studies on human lactation. I. Within-feed and between-breast variation in selected components of human milk*. Am J Clin Nutr, 1984. **40**(3): p. 635-46.
220. Dewey, K.G., et al., *Do exclusively breast-fed infants require extra protein?* Pediatr Res, 1996. **39**(2): p. 303-7.

221. Gross, S.J., et al., *Nutritional composition of milk produced by mothers delivering preterm*. J Pediatr, 1980. **96**(4): p. 641-4.
222. Schanler, R.J. and W. Oh, *Composition of breast milk obtained from mothers of premature infants as compared to breast milk obtained from donors*. J Pediatr, 1980. **96**(4): p. 679-81.
223. Hambraeus, L., *Proprietary milk versus human breast milk in infant feeding. A critical appraisal from the nutritional point of view*. Pediatr Clin North Am, 1977. **24**(1): p. 17-36.
224. Billeaud, C., J. Guillet, and B. Sandler, *Gastric emptying in infants with or without gastro-oesophageal reflux according to the type of milk*. Eur J Clin Nutr, 1990. **44**(8): p. 577-83.
225. Rassin, D.K., et al., *Milk protein quantity and quality in low-birth-weight infants. IV. Effects on tyrosine and phenylalanine in plasma and urine*. J Pediatr, 1977. **90**(3): p. 356-60.
226. Gaull, G.E., et al., *Milk protein quantity and quality in low-birth-weight infants. III. Effects on sulfur amino acids in plasma and urine*. J Pediatr, 1977. **90**(3): p. 348-55.
227. Jarvenpaa, A.L., et al., *Milk protein quantity and quality in the term infant. II. Effects on acidic and neutral amino acids*. Pediatrics, 1982. **70**(2): p. 221-30.
228. Jarvenpaa, A.L., et al., *Milk protein quantity and quality in the term infant. I. Metabolic responses and effects on growth*. Pediatrics, 1982. **70**(2): p. 214-20.
229. Jakobsson, I., et al., *Dietary bovine beta-lactoglobulin is transferred to human milk*. Acta Paediatr Scand, 1985. **74**(3): p. 342-5.
230. Savilahti, E. and M. Kuitunen, *Allergenicity of cow milk proteins*. J Pediatr, 1992. **121**(5 Pt 2): p. S12-20.
231. Goldman, A.S., et al., *Immunologic protection of the premature newborn by human milk*. Semin Perinatol, 1994. **18**(6): p. 495-501.
232. Lonnerdal, B., *Biochemistry and physiological function of human milk proteins*. Am J Clin Nutr, 1985. **42**(6): p. 1299-317.
233. Hanson, L.A., et al., *Protective factors in milk and the development of the immune system*. Pediatrics, 1985. **75**(1 Pt 2): p. 172-6.
234. Carlson, S.E., *Human milk nonprotein nitrogen: occurrence and possible functions*. Adv Pediatr, 1985. **32**: p. 43-70.
235. Uauy, R., R. Quan, and A. Gil, *Role of nucleotides in intestinal development and repair: implications for infant nutrition*. J Nutr, 1994. **124**(8 Suppl): p. 1436S-1441S.
236. Schaller, J.P., et al., *Effect of dietary ribonucleotides on infant immune status. Part 1: Humoral responses*. Pediatr Res, 2004. **56**(6): p. 883-90.
237. Buck, R.H., et al., *Effect of dietary ribonucleotides on infant immune status. Part 2: Immune cell development*. Pediatr Res, 2004. **56**(6): p. 891-900.
238. Jensen, R.G., *The lipids in human milk*. Prog Lipid Res, 1996. **35**(1): p. 53-92.
239. Hernell, O. and L. Blackberg, *Human milk bile salt-stimulated lipase: functional and molecular aspects*. J Pediatr, 1994. **125**(5 Pt 2): p. S56-61.
240. Jensen, R.G. and G.L. Jensen, *Specialty lipids for infant nutrition. I. Milks and formulas*. J Pediatr Gastroenterol Nutr, 1992. **15**(3): p. 232-45.
241. Sauerwald, T.U., H. Demmelmair, and B. Koletzko, *Polyunsaturated fatty acid supply with human milk*. Lipids, 2001. **36**(9): p. 991-6.
242. Uauy, R., et al., *Essential fatty acids in visual and brain development*. Lipids, 2001. **36**(9): p. 885-95.

243. Butte, N.F., C. Garza, and E.O. Smith, *Variability of macronutrient concentrations in human milk*. Eur J Clin Nutr, 1988. **42**(4): p. 345-9.
244. Mandel, D., et al., *Fat and energy contents of expressed human breast milk in prolonged lactation*. Pediatrics, 2005. **116**(3): p. e432-5.
245. Daly, S.E., et al., *Degree of breast emptying explains changes in the fat content, but not fatty acid composition, of human milk*. Exp Physiol, 1993. **78**(6): p. 741-55.
246. Nommsen, L.A., et al., *Determinants of energy, protein, lipid, and lactose concentrations in human milk during the first 12 mo of lactation: the DARLING Study*. Am J Clin Nutr, 1991. **53**(2): p. 457-65.
247. Butte, N.F., et al., *Effect of maternal diet and body composition on lactational performance*. Am J Clin Nutr, 1984. **39**(2): p. 296-306.
248. Ziegler, E.E. and S.J. Fomon, *Lactose enhances mineral absorption in infancy*. J Pediatr Gastroenterol Nutr, 1983. **2**(2): p. 288-94.
249. Venkataraman, P.S., H. Luhar, and M.J. Neylan, *Bone mineral metabolism in full-term infants fed human milk, cow milk-based, and soy-based formulas*. Am J Dis Child, 1992. **146**(11): p. 1302-5.
250. Greer, F.R., et al., *Bone mineral content and serum 25-hydroxyvitamin D concentrations in breast-fed infants with and without supplemental vitamin D: one-year follow-up*. J Pediatr, 1982. **100**(6): p. 919-22.
251. Neville, M.C. and C.D. Watters, *Secretion of calcium into milk: review*. J Dairy Sci, 1983. **66**(3): p. 371-80.
252. Jones, G., M. Riley, and T. Dwyer, *Breastfeeding in early life and bone mass in prepubertal children: a longitudinal study*. Osteoporos Int, 2000. **11**(2): p. 146-52.
253. Casey, C.E., K.M. Hambidge, and M.C. Neville, *Studies in human lactation: zinc, copper, manganese and chromium in human milk in the first month of lactation*. Am J Clin Nutr, 1985. **41**(6): p. 1193-200.
254. Dallman, P.R., M.A. Siimes, and A. Stekel, *Iron deficiency in infancy and childhood*. Am J Clin Nutr, 1980. **33**(1): p. 86-118.
255. Lonnerdal, B. and O. Hernell, *Iron, zinc, copper and selenium status of breast-fed infants and infants fed trace element fortified milk-based infant formula*. Acta Paediatr, 1994. **83**(4): p. 367-73.
256. Misra, S., et al., *Chronic liver disease in children on long-term parenteral nutrition*. J Gastroenterol Hepatol, 1996. **11**(5): p. S4-6.
257. Fabrino, H.J., et al., *Multivariate approach in the optimization procedures for the direct determination of manganese in serum samples by graphite furnace atomic absorption spectrometry*. J Anal Toxicol, 2011. **35**(8): p. 571-6.
258. Pinto, F.G., et al., *Determination of manganese in urine and whole blood samples by electrothermal atomic absorption spectrometry: comparison of chemical modifiers*. Anal Sci, 2006. **22**(12): p. 1605-9.
259. López Colón, J.L. (Director), *Validación metodológica y cálculo de incertidumbres. Aplicación práctica en el caso de elementos traza*. Editado por el comité de publicaciones de las SEQC. 2009.
260. Abdulrazzaq, Y.M., Osman, N., Nagelkerke, N., Kosanovic, M. and Adem, A., *Trace element composition of plasma and breast milk of well-nourished women*. J. Env. Sci. Health - Part A Toxic/Hazardous Substances and Environmental Engineering 2008. **43**(3): p. 329-34.
261. Goshima, M., Murakami, T., Nakagaki, H., Shibata, T., Sugiyama, T., Kato, K., Narita, N. and Nishimuta, M., *Iron, Zinc, Manganese and Copper Intakes in*

- Japanese Children Aged 3 to 5 Years*. J. Nutr. Sci. Vitaminol. 2008. **54**(6): p. 475-82
262. Al-Awadi, F.M. and Srikumar, T.S., *Trace-element status in milk and plasma of Kuwaiti and non-Kuwaiti lactating mothers*. Nutrition. 2000. **16**(11-12): p. 1069-73.
263. Lei, Y., Liu, Z., Zhao, J., Dai, X., Yang, Z., Zhu, Y., Zhai, L. and Wang, L., *Eight years' dynamic observation on content of Zn, Cu, Fe, Mn, Se and Ca in hair of children with Keshan disease in Huangling county of Shaanxi province*. J. Xi'an Jiaotong Univ. (Medical Sciences). 2005. **26**(6): p. 604-6.
264. Hoshi A., Watanabe, H., Chiba, M., Inaba, Y., Kobayashi, M., Kimura, N. and Ito, T., *Seasonal variation of trace element loss to sweat during exercise in males* Environmental Health and Preventive Medicine 2002. **7**(2) : p. 60-3.
265. Yokoyama, K., Araki, S., Sato, H. and Aono, H., *Circadian rhythms of seven heavy metals plasma, erythrocytes and urine in men: Observation in metal workers* Ind. Health. 2000. **38**(2): p. 205-12.
266. Mehra, R. and Juneja, M., *Variation of concentration of heavy metals, calcium and magnesium with sex as determined by atomic absorption spectrophotometry*. Indian J. Environm. Health. 2003. **45**(4): p. 317-24.
267. Favier, A. and Ruffieux, D. *Physiological variations of serum levels of copper, zinc, iron and manganese*. Biomed.& Pharmacother.1983. **37**(9-10): p. 462-6.
268. L.M. Voth, *Pyrolytic Graphite Plaraforms- Guidelines for use with the GTA-95 Graphite Tube Atomizer*. Varian AA resource Center Park Ridge, Illinois USA Number AA-45. March 1985.